

# **Implicaciones patológicas del desequilibrio redox:**

Estudio del papel de la mitocondria en el proceso inflamatorio del sinoviocito y estudio de la participación de Nrf2 en la capacidad angiogénica endotelial.

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR INTERNACIONAL

**Marta Noa Valcárcel Ares**

---

**TESIS DOCTORAL**

**2014**

Directora: **M<sup>a</sup> José López Armada**

Tutor: **Isaac Fuentes Boquete**

**POP CIENCIAS DA SAÚDE**



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**





UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**M<sup>a</sup> JOSÉ LÓPEZ ARMADA**, Doutora en Ciencias Biolóxicas e Investigadora Miguel Servet no Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC),

**CERTIFICA:**

Que o presente traballo, que leva por título **“Implicaciones patolóxicas del desequilibrio redox: Estudio del papel de la mitocondria en el proceso inflamatorio del sinoviocito y estudio de la participación de Nrf2 en la capacidad angiogénica endotelial”**, foi realizado por **Marta Noa Valcárcel Ares** baixo a miña dirección no INIBIC e reúne as condicións necesarias de orixinalidade e rigor científico para optar ao grao de doutor internacional en Ciencias da Saúde.

A Coruña, a 10 de Xaneiro de 2014.

Asdo. Dra. M<sup>a</sup> José López Armada







UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**ISAAC FUENTES BOQUETE**, profesor do Departamento de Medicina da Facultade de Ciencias da Saúde na Universidade da Coruña,

**CERTIFICA:**

Que o presente traballo, que leva por título **“Implicaciones patológicas del desequilibrio redox: Estudio del papel de la mitocondria en el proceso inflamatorio del sinoviocito y estudio de la participación de Nrf2 en la capacidad angiogénica endotelial”**, foi realizado por **Marta Noa Valcárcel Ares** no INIBIC baixo a miña tutela dende o Departamento de Medicina da UDC e reúne as condicións necesarias de orixinalidade e rigor científico para optar ao grao de doutor internacional en Ciencias da Saúde.

A Coruña, a 10 de Xaneiro de 2014.

Asdo. Dr. Isaac Fuentes Boquete





Parte de la investigación incluida en esta tesis ha sido realizada bajo la supervisión del Dr. Zoltan Ungvari, profesor adjunto, director del Laboratorio de Envejecimiento Cardiovascular en el Reynolds Oklahoma Center on Aging (University of Oklahoma Health Sciences Center) y la Dra. Anna Csiszar, profesora adjunta, durante una estancia de investigación predoctoral en 2010.

Part of the research included in this thesis has been carried out under the supervision of Zoltan Ungvari MD, PhD, Associate Professor, leader of the Cardiovascular Aging Laboratory in the Reynolds Oklahoma Center on Aging (University of Oklahoma Health Sciences Center) and Anna Csiszar, MD, PhD, Associate Professor, during a pre-doctoral fellowship in 2010.



*Aos meus pais*



## AGRADECEMENTOS

Son moitas as persoas que contribuíron a que agora mesmo poida estar rematando a escritura desta tese. Por iso, conxuntamente, quero darlle as gracias a todos aqueles que dunha ou outra maneira me botaron unha man durante estes anos e que contribuíron con humor e amabilidade a crear un ambiente que de seguro botarei de menos.

En primeiro lugar, teño que agradecer á miña directora, María, por darme a oportunidade de comezar no mundo da investigación. Pola súa axuda, por entenderme, e por proporcionarme sempre o punto de vista máis optimista. Tamén a Isaac, o meu titor, por guiarme e axudarme de bo grado a través de cantas xestións necesitei.

Agradezo á Xunta de Galicia ó financiamento concedido, e á *Sociedad Española de Reumatología*, pola gran labor que desenvolve apoiándonos en eventos formativos.

Merecen unha mención especial tódolos donantes que, nunha situación difícil, deciden proporcionarnos as mostras necesarias para levar a cabo esta investigación.

A Bea C., Berta e Bea L., as persoas que me axudaron a dar os primeiros pasos no laboratorio. A tódolos compañeiros que me resolveron dúbidas, me ensinaron técnicas ou me axudaron a resolver problemas. En especial, gracias a Mar, a Puri, a Mariajo e a Merce, que me iluminan con infinita paciencia cando non teño máis que preguntas. Tamén a Isa, Dolo, María, Vane e Nati, que sempre me alegran a hora da comida.

Ao meu grupo de inflamados, sen dúbida, os mellores compañeiros que puiden ter. Charlie e Romi, capaces ata de facer divertida unha tarde de citometrías. Laura, todo bondade e disposición para traballar. E Jesús, a última adquisición, para poñer a guinda ó pastel. Incluíu tamén ás adoptadas Mariana e Emma, que xa emprenderon voo polo mundo adiante, pero seguen inspirándome coa súa paixón pola investigación. A todos, gracias. Non creo que sexades conscientes de canto vos debo.

A Zoltan e Anna, do *Reynolds Oklahoma Center on Aging*, que me aceptaron no seu grupo acolléndome como a unha máis da familia. A Danka, Judy e Paula, pola axuda inestimable.

A Isabel Siso, do Departamento de Bioquímica da UDC, pola súa xenerosa colaboración.

Aos amigos de fóra do laboratorio, por facerme desconectar cando máis o necesito. Especialmente a Carlos, a Ángel, e a Gema, por ter estado sempre comigo da maneira en que o están os amigos de verdade.

A Alberto, que me fixo mellor científica e persoa. E porque, con inesgotable comprensión, me acompañou, me animou e me apoiou, sen importar dificultades nin franxas horarias.

E por suposto, a miña familia. Especialmente a meus pais, porque a eles lles debo todo.

**Gracias.**





## RESUMO

Neste traballo estúdiouse a implicación do estrés oxidativo na artrite reumatoide (AR) e na disfunción vascular asociada ao envellecemento.

Na AR, caracterizada pola inflamación no tecido sinovial, encontráronse alteracións mitocondriais que poden participar no curso da enfermidade. Neste traballo investigouse a relación entre a disfunción mitocondrial dos sinoviocitos humanos co grao de inflamación. Observouse que a inhibición da función mitocondrial induce a resposta inflamatoria nos sinoviocitos en canto a inducción de estrés oxidativo e produción dos mediadores inflamatorios COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8. Ademais, agrava a resposta inflamatoria inducida por IL-1 $\beta$  e promove a anxioxénese. O polifenol natural resveratrol foi capaz de previr os efectos da disfunción mitocondrial.

Por outra parte, durante o envellecemento tense descrito unha diminución na actividade do factor de resposta antioxidante Nrf2 e unha resposta anxioxénica deteriorada que afecta á microcirculación en certos tecidos. Neste traballo determinouse se a disfunción da actividade Nrf2 afecta á capacidade anxioxénica de células endoteliais de arteria coronaria. Encontrouse que o silenciamento de Nrf2 nestas células inhibe os procesos anxioxénicos de migración, proliferación, adhesión e formación de tubos, e que ademais sensibiliza ás células endoteliais á morte por apoptose.

## RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la implicación del estrés oxidativo en la artritis reumatoide (AR) y en la disfunción vascular asociada al envejecimiento.

En la AR, caracterizada por la inflamación en el tejido sinovial, se han encontrado alteraciones mitocondriales que pueden participar en el curso de la enfermedad. En este trabajo se investigó la relación entre la disfunción mitocondrial de los sinoviocitos humanos con el grado de inflamación. Se observó que la inhibición de la función mitocondrial induce la respuesta inflamatoria en los sinoviocitos en cuanto a inducción de estrés oxidativo y producción de los mediadores inflamatorios COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8. Además, agrava la respuesta inflamatoria inducida por IL-1 $\beta$  y promueve la angiogénesis. El polifenol natural resveratrol fue capaz de prevenir los efectos de la disfunción mitocondrial.

Por otra parte, durante el envejecimiento se ha descrito una disminución en la actividad del factor de respuesta antioxidante Nrf2 y una respuesta angiogénica deteriorada que afecta a la microcirculación en ciertos tejidos. En este trabajo se determinó si la disfunción de la actividad Nrf2 afecta a la capacidad angiogénica de células endoteliales de arteria coronaria. Se ha encontrado que el silenciamiento de Nrf2 en estas células inhibe los procesos angiogénicos de migración, proliferación, adhesión y formación de tubos, y que además sensibiliza a las células endoteliales a la muerte por apoptosis.

## ABSTRACT

In this work, involvement of oxidative stress in rheumatoid arthritis (RA) and age-related vascular dysfunction has been studied.

In RA, characterized by synovial inflammation, mitochondrial alterations that might participate in the course of the disease have been found. In this work, the link between mitochondrial dysfunction in human synoviocytes and the inflammation level has been investigated. Inhibition of mitochondrial function has been found to induce the inflammatory response in synoviocytes in terms of oxidative stress induction and production of the inflammatory mediators COX-2, PGE<sub>2</sub> and IL-8. Besides, it aggravates the inflammatory response induced by IL-1 $\beta$  and promotes angiogenesis. The natural polyphenol resveratrol was able to prevent the effects of mitochondrial dysfunction.

On the other hand, during aging it has been described a diminished activity of the antioxidant response factor Nrf2 and an impaired angiogenic response that affects microcirculation in several tissues. In this work, we determined whether impaired Nrf2 activity affects angiogenic capacity of coronary artery endothelial cells. It was found that Nrf2 dysfunction impairs angiogenic processes of migration, proliferation, adhesion, and tube formation. Besides, it sensitizes endothelial cells to apoptotic death.



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. EL ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A PATOLOGÍAS HUMANAS .....	3
2. MITOCONDRIA Y ESTRÉS OXIDATIVO .....	8
2.1. La mitocondria .....	8
2.2. El estrés oxidativo celular .....	11
2.2.1. Producción de especies reactivas de oxígeno .....	11
2.2.2. El daño oxidativo .....	12
3. LOS SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2 .....	13
3.1. Nrf2 en el envejecimiento .....	15
4. ARTRITIS REUMATOIDE .....	16
4.1. Posible etiología de la AR .....	16
4.2. El tejido sinovial .....	17
4.2.1. El tejido sinovial normal .....	17
4.2.2. El tejido sinovial reumatoide .....	18
4.3. Los sinoviocitos .....	20
4.3.1. Sinoviocitos e inflamación .....	21
4.3.2. Sinoviocitos y angiogénesis .....	24
4.4. Rutas de señalización en AR .....	25
4.5. Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en AR .....	30
5. EL ENVEJECIMIENTO EN EL SISTEMA VASCULAR .....	33
5.1. El sistema vascular .....	33
5.2. La teoría del envejecimiento en el sistema vascular .....	36
5.3. Disfunción de Nrf2 asociada a la edad en el sistema vascular .....	37
5.4. El proceso de angiogénesis y su disfunción en el envejecimiento .....	38
5.4.1. El proceso de angiogénesis .....	39
5.4.2. Reguladores del proceso angiogénico durante el envejecimiento .....	40
5.4.3. Disfunción en el proceso de angiogénesis .....	42
6. ESTRATEGIAS ANTIOXIDANTES: EL RESVERATROL .....	44
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
<b>A. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL PROCESO INFLAMATORIO DEL SINOVIOCITO HUMANO NORMAL EN CULTIVO .....</b>	<b>54</b>
1. CULTIVO CELULAR .....	54
1.1. Obtención de muestras de tejido sinovial .....	54
1.2. Cultivo primario de sinoviocitos .....	54

1.3. Estimulación celular .....	55
2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....	55
3. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ATP .....	56
4. DETECCIÓN DE ROS .....	57
4.1. Determinación de peróxido de hidrógeno intracelular .....	57
4.2. Determinación de superóxido intracelular y mitocondrial .....	58
5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE ARN .....	58
5.1. Extracción de ARNm y tratamiento con ADNasa .....	59
5.2. Retrotranscripción de ARN a ADNc .....	59
5.3. PCR a tiempo real .....	60
6. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA DE COX-1/COX-2 MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	61
7. ELISA .....	62
7.1. ELISA de PGE <sub>2</sub> .....	62
7.2. ELISA de IL-8 .....	63
8. ESTUDIOS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN .....	63
8.1. Inmunofluorescencia de la subunidad p65 .....	63
8.2. Extracción nuclear .....	64
8.3. Ensayo de retardo en gel .....	65
9. ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR .....	66
10. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS .....	67
10.1. Cultivo de células endoteliales .....	67
10.2. Desarrollo del ensayo de formación de tubos .....	67
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	69
<b>B. ESTUDIO DEL PAPEL DE NRF2 EN LA CAPACIDAD DE ANGIOGÉNESIS EN CÉLULAS</b>	
<b>ENDOTELIALES DE ARTERIA CORONARIA HUMANAS EN CULTIVO .....</b>	<b>71</b>
1. CULTIVO CELULAR .....	71
2. SILENCIAMIENTO DE NRF2 Y SOBREENPRESIÓN DE KEAP-1 .....	71
2.1 Vectores para la inhibición de Nrf2 .....	71
2.2 Clonaje, amplificación y purificación de los plásmidos .....	73
2.2.1. Transformación .....	73
2.2.2. Amplificación .....	74
2.2.3. Preparación del plásmido a gran escala mediante lisis alcalina .....	75
2.2.4. Purificación del plásmido mediante bromuro de etidio/CsCl .....	76
2.3. Transfección de los plásmidos .....	78
3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NRF2 MEDIANTE ENSAYO DE GEN REPORTERO ..	80
4. ENSAYOS DE ANGIOGÉNESIS .....	82
4.1. Valoración de la migración celular .....	82
4.2. Ensayo de proliferación celular .....	84
4.3. Ensayo de adhesión celular .....	85
4.4. Ensayo de formación de tubos .....	86
5. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS-3/7 .....	87

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	88
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>89</b>
<b>A. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SOBRE EL PROCESO INFLAMATORIO DEL SINOVIOCITO HUMANO EN CULTIVO .....</b>	<b>91</b>
1. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SOBRE LA RESPUESTA OXIDATIVA E INFLAMATORIA EN EL SINOVIOCITO HUMANO NORMAL EN CULTIVO .....	91
1.1 Valoración de la eficacia de la oligomicina para la inducción de disfunción mitocondrial .....	91
1.1.1. Efecto de OLI sobre el potencial de membrana mitocondrial .....	92
1.1.2. Efecto de OLI sobre la producción de ATP .....	93
1.2. Efecto de la disfunción mitocondrial en la producción de especies reactivas de oxígeno .....	94
1.2.1. Cuantificación de la producción de peróxido de hidrógeno celular total .....	94
1.2.2. Detección de superóxido intracelular y mitocondrial .....	95
1.3. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de mediadores inflamatorios .....	96
1.3.1. Expresión de COX-2 .....	97
1.3.2. Producción de PGE <sub>2</sub> .....	98
1.3.3. Expresión de IL-8 .....	99
2. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR INTERLEUQUINA-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) EN SINOVIOCITOS HUMANOS NORMALES EN CULTIVO .....	101
2.1. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 $\beta$ .....	101
2.2. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la liberación de PGE <sub>2</sub> inducida por IL-1 $\beta$ .....	105
2.3. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1 $\beta$ .....	105
2.4 Influencia de la dosis de OLI sobre la inducción de la respuesta inflamatoria ..	107
3. VIABILIDAD CELULAR TRAS EL TRATAMIENTO DE LOS SINOVIOCITOS CON LOS ESTÍMULOS A ESTUDIO .....	109
4. MEDIADORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL .....	111
4.1. Especies reactivas de oxígeno .....	111
4.2. Factor de transcripción NF- $\kappa$ B .....	113
4.3. Otros factores de transcripción: AP-1 y Nrf2 .....	116
4.4. Implicación de la ruta apoptótica en la respuesta inflamatoria inducida por disfunción mitocondrial .....	118
5. REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS CON OTROS INDUCTORES DE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL: ANTIMICINA A Y PARAQUAT .....	120
5.1. Inducción de disfunción mitocondrial mediante el uso de AA y PQ .....	120
5.2. Producción de ROS inducida por AA y PQ .....	121
5.3. Activación de NF- $\kappa$ B inducida por AA y PQ .....	121
5.4. Efecto de AA y PQ en la respuesta inflamatoria de sinoviocitos humanos en cultivo .....	122
5.5. Viabilidad celular en los sinoviocitos tratados con AA o PQ .....	123

6. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SOBRE LA RESPUESTA ANGIOGÉNICA DE LOS SINOVIOCITOS HUMANOS NORMALES EN CULTIVO .....	125
6.1. Estudio de la activación del factor de transcripción HIF-1 en sinoviocitos con disfunción mitocondrial .....	125
6.2. Estudio de la expresión de VEGF en sinoviocitos humanos con disfunción mitocondrial .....	126
6.3. Estudio de la capacidad de los sinoviocitos con disfunción mitocondrial para inducir la formación de tubos en células endoteliales .....	127
7. EFECTO DEL RESVERATROL (RSV) EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA PATOLÓGICA INDUCIDA POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL .....	130
7.1. Efecto del RSV sobre la producción de ROS inducida por OLI .....	130
7.2. Efecto del RSV sobre la activación de NF-κB inducida por OLI .....	131
7.3. Efecto del RSV sobre la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por disfunción mitocondrial .....	133
7.4. Efecto del RSV sobre la expresión de VEGF y la inducción de la formación de tubos mediada por sinoviocitos con disfunción mitocondrial .....	134
<b>B. PAPEL DE NRF2 EN LA CAPACIDAD ANGIOGÉNICA DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA CORONARIA HUMANAS .....</b>	<b>136</b>
1. EFECTO DE VEGF E IGF-1 SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE NRF2 EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA CORONARIA HUMANAS EN CULTIVO .....	136
2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE NRF2 EN LA CAPACIDAD ANGIOGÉNICA DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA ARTERIA CORONARIA HUMANAS .....	138
2.1. Efecto de la inhibición de Nrf2 en la capacidad de migración de las células endoteliales .....	138
2.2. Efecto de la inhibición de Nrf2 en la capacidad de proliferación de las células endoteliales .....	139
2.3. Efecto de la inhibición de Nrf2 en la capacidad de adhesión de las células endoteliales .....	140
2.4. Efecto de la inhibición de Nrf2 en la capacidad de formación de tubos de las células endoteliales .....	143
3. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE NRF2 EN LA SENSIBILIDAD A LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA ARTERIA CORONARIA HUMANAS .....	146
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>175</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>202</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Situaciones de equilibrio y desequilibrio redox .....	5
<b>Figura 2</b>	Ejemplos de enfermedades relacionadas con estrés oxidativo .....	7
<b>Figura 3</b>	Estructura y compartimentalización de la mitocondria .....	8
<b>Figura 4</b>	La fosforilación oxidativa .....	10
<b>Figura 5</b>	Estructura de la ATP sintasa mitocondrial .....	11
<b>Figura 6</b>	Mecanismo de regulación y activación de Nrf2 .....	14
<b>Figura 7</b>	Evolución de la patogénesis de la AR en la articulación de la rodilla .....	19
<b>Figura 8</b>	Cascada de reacciones para la síntesis de prostaglandinas .....	23
<b>Figura 9</b>	Esquema general de la activación de NF- $\kappa$ B .....	27
<b>Figura 10</b>	Procesos de señalización celular en los que está implicado el sinoviocito AR .....	29
<b>Figura 11</b>	Evidencias de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en sinoviocitos AR .....	31
<b>Figura 12</b>	Estructura general de un vaso sanguíneo .....	34
<b>Figura 13</b>	Estructura de un capilar sanguíneo .....	35
<b>Figura 14</b>	Modulación del proceso angiogénico dependiente del grado de estrés oxidativo en condiciones fisiológicas y patológicas .....	37
<b>Figura 15</b>	El proceso de angiogénesis .....	40
<b>Figura 16</b>	Estructura química del resveratrol .....	44
<b>Figura 17</b>	Esquema del procedimiento para la realización del ensayo de formación de tubos .....	69
<b>Figura 18</b>	Mapa génico del vector plasmídico utilizado en el silenciamiento de Nrf2 ..	72
<b>Figura 19</b>	Mecanismo de acción del ARNhc de Nrf2 .....	73
<b>Figura 20</b>	Purificación del ADN plasmídico mediante marcaje con BrEt en un gradiente de CsCl .....	77
<b>Figura 21</b>	Sistema de electroporación Amaxa Nucleofector .....	79
<b>Figura 22</b>	Representación esquemática de las construcciones usadas en el ensayo de gen reportero .....	80
<b>Figura 23</b>	Imagen de una placa ECIS 8W1E .....	82
<b>Figura 24</b>	Componentes del sistema ECIS .....	84
<b>Figura 25</b>	Determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en respuesta a la exposición a OLI .....	93
<b>Figura 26</b>	Determinación de la producción de ATP en respuesta a OLI .....	94

<b>Figura 27</b>	Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en sinoviocitos humanos estimulados con una curva de dosis de OLI .....	95
<b>Figura 28</b>	Determinación de la producción de superóxido total y mitocondrial en respuesta a la exposición a OLI .....	96
<b>Figura 29</b>	Expresión de COX-2 inducida por disfunción mitocondrial en sinoviocitos humanos normales .....	97
<b>Figura 30</b>	Comparación entre la modulación de COX-1 y COX-2 en respuesta a OLI en sinoviocitos .....	98
<b>Figura 31</b>	Producción de PGE <sub>2</sub> en sinoviocitos humanos normales estimulados con OLI .....	99
<b>Figura 32</b>	Expresión de ARNm y proteína de IL-8 en sinoviocitos humanos expuestos a OLI .....	100
<b>Figura 33</b>	Esquema experimental para estudiar la expresión de mediadores inflamatorios inducida por IL-1 $\beta$ en células con disfunción mitocondrial ....	101
<b>Figura 34</b>	Expresión génica y proteica de COX-2 en sinoviocitos humanos tratados con la combinación IL-1 $\beta$ + OLI .....	103
<b>Figura 35</b>	Curva de expresión proteica de COX-2 en sinoviocitos humanos sometidos a disfunción mitocondrial en presencia de distintas dosis de IL-1 $\beta$ .....	104
<b>Figura 36</b>	Producción de PGE <sub>2</sub> en sinoviocitos humanos tratados con IL-1 $\beta$ + OLI .....	105
<b>Figura 37</b>	Expresión de ARNm y proteína de IL-8 en sinoviocitos humanos estimulados con IL-1 $\beta$ + OLI .....	106
<b>Figura 38</b>	Efecto de OLI 1 $\mu$ g/ml, en comparación con OLI 10 $\mu$ g/ml, en la respuesta inflamatoria de sinoviocitos humanos estimulados o no con IL-1 $\beta$ .....	107
<b>Figura 39</b>	Producción sinérgica de IL-8 en sinoviocitos humanos estimulados durante 9, 24 o 48 h .....	108
<b>Figura 40</b>	Determinación de la muerte celular inducida por los estímulos empleados	110
<b>Figura 41</b>	Efecto de la preincubación con NAC en la expresión de COX-2 inducida por OLI o la combinación IL-1 $\beta$ + OLI .....	112
<b>Figura 42</b>	Efecto de la preincubación con mitoTEMPO en la producción de IL-8 inducida por OLI o la combinación IL-1 $\beta$ + OLI .....	113
<b>Figura 43</b>	Esquema del proceso experimental para el estudio de NF- $\kappa$ B .....	114
<b>Figura 44</b>	Detección de p65 en células sometidas a disfunción mitocondrial en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$ .....	114
<b>Figura 45</b>	Actividad nuclear de NF- $\kappa$ B en sinoviocitos sometidos a disfunción mitocondrial en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$ .....	115
<b>Figura 46</b>	Efecto de la preincubación con BAY en la respuesta inflamatoria inducida por la combinación de IL-1 $\beta$ + OLI .....	116
<b>Figura 47</b>	Actividad del factor de transcripción AP-1 en sinoviocitos sometidos a disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ .....	117

<b>Figura 48</b>	Actividad del factor de transcripción Nrf2 en sinoviocitos sometidos a disfunción mitocondrial .....	118
<b>Figura 49</b>	Efecto del inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK en la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ en sinoviocitos humanos en cultivo .....	119
<b>Figura 50</b>	Determinación del $\Delta\Psi_m$ en sinoviocitos tratados con AA y PQ .....	120
<b>Figura 51</b>	Determinación de la producción de superóxido en sinoviocitos tratados con AA y PQ .....	121
<b>Figura 52</b>	Estudio de la expresión y traslocación de p65 en sinoviocitos tratados con AA y PQ .....	122
<b>Figura 53</b>	Efecto de AA y PQ en la inducción de COX-2 e IL-8, respectivamente, en sinoviocitos humanos .....	123
<b>Figura 54</b>	Determinación de la muerte celular inducida por AA o PQ en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$ .....	124
<b>Figura 55</b>	Actividad del factor de transcripción HIF-1 en sinoviocitos sometidos a disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ .....	126
<b>Figura 56</b>	Efecto de la disfunción mitocondrial en la expresión génica de VEGF .....	127
<b>Figura 57</b>	Ensayo de formación de tubos endoteliales mediado por los sobrenadantes de sinoviocitos con disfunción mitocondrial .....	128
<b>Figura 58</b>	Efecto del RSV en la producción de ROS inducida por la disfunción mitocondrial .....	131
<b>Figura 59</b>	Efecto del RSV en la activación de NF- $\kappa$ B inducida por la disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ .....	132
<b>Figura 60</b>	Efecto del RSV en la modulación de la respuesta inflamatoria inducida por la combinación de IL-1 $\beta$ + OLI .....	133
<b>Figura 61</b>	Modulación de los efectos angiogénicos de la disfunción mitocondrial mediante RSV .....	135
<b>Figura 62</b>	Actividad transcripcional de Nrf2 en células endoteliales humanas tratadas con IGF-1 o VEGF .....	137
<b>Figura 63</b>	Cuantificación de la capacidad de migración de células endoteliales con silenciamiento de Nrf2 .....	139
<b>Figura 64</b>	Capacidad proliferativa inducida por VEGF e IGF-1 de células endoteliales con silenciamiento de Nrf2 .....	140
<b>Figura 65</b>	Capacidad de adhesión a proteínas de la matriz extracelular inducida por VEGF e IGF-1 de células endoteliales con disfunción de Nrf2 .....	142
<b>Figura 66</b>	Tiempo de adhesión a colágeno inducida por VEGF de células endoteliales con disfunción de Nrf2 .....	143
<b>Figura 67</b>	Formación de tubos inducida por VEGF e IGF-1 en células endoteliales con disfunción de Nrf2 .....	144

<b>Figura 68</b>	Actividad de las caspasas 3/7 en células endoteliales con silenciamiento de Nrf2 en condiciones basales o tratadas con estímulos apoptóticos .....	147
<b>Figura 69</b>	Posible vía de amplificación de la respuesta inflamatoria en sinoviocitos con disfunción mitocondrial mediante la activación del inflamasoma .....	161
<b>Figura 70</b>	Esquema teórico de las rutas implicadas en la respuesta inflamatoria y angiogénica inducida por la disfunción mitocondrial .....	167

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Ejemplos de genes diana de NF- $\kappa$ B en función de su efecto en la articulación AR .....	26
<b>Tabla 2</b>	Cebadores empleados en la PCR a tiempo real .....	61
<b>Tabla 3</b>	Composición de las soluciones necesarias en el proceso de transformación .....	74
<b>Tabla 4</b>	Composición de las soluciones necesarias en el proceso de preparación de plásmido .....	76
<b>Tabla 5</b>	Composición del tampón de lisis celular .....	81
<b>Tabla 6</b>	Estímulos apoptóticos utilizados para medir actividad de caspasas 3/7 .....	87



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**$\Delta\Psi_m$** : Potencial de membrana mitocondrial

**AA**: Antimicina A

**ADN**: Ácido desoxirribonucleico

**ADNc**: ADN complementario

**ADNmt**: ADN mitocondrial

**Amp**: Ampicilina

**AMP**: Adenosín monofosfato

**AMPC**: AMP cíclico

**AMPK**: Quinasa activada por AMP

**AP-1**: Proteína activadora-1

**AR**: Artritis reumatoide

**ARE**: Elementos de respuesta antioxidante

**ARN**: Ácido ribonucleico

**ARNm**: ARN mensajero

**ATP**: Adenosín trifosfato

**BrEt**: Bromuro de etidio

**BSA**: Albúmina sérica bovina

**CAT**: Catalasa

**COX-1/2**: Ciclooxygenasa-1/2

**CRM**: Cadena respiratoria mitocondrial

**DAMP**: Patrón molecular asociado a daño (*Damage-associated molecular pattern*)

**DAPI**: 4', 6'-diamidino-2-fenilindol

**DCFH-DA**: 2',7'-diclorofluoresceína diacetato

**DHE**: Dihidroetidio

**EDTA**: Ácido etilendiaminoteraacético

**EEM**: Error estándar de la media

**ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

**EMSA:** Ensayo de retardo en gel (*Electrophoretic mobility shift assay*)

**eNOS:** Sintasa de óxido nítrico endotelial

**ERK:** Quinasa regulada por señal extracelular

**FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**FR:** Factor Reumatoide

**GCL:** Glutamato cisteín ligasa

**GM-CSF:** Factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos

**GPx:** Glutación peroxidasa

**GSH:** Glutación

**GSTs:** Glutación-S-transferasas

**HBSS:** *Hank's balanced salt solution*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**HIF:** Factor inducible por hipoxia

**HO-1:** Hemooxigenasa-1

**HPRT:** Hipoxantina fosfo-ribosil transferasa 1

**IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico

**IKK:** Quinasa de IκB

**IL:** Interleuquina

**IL-1Ra:** Antagonista del receptor de IL-1

**iNOS:** Sintasa de óxido nítrico inducible

**IP:** Ioduro de propidio

**JNK:** Quinasa c-jun amino terminal

**Keap1:** *Kelch-like ECH-associated protein 1*

**LDLox:** Lipoproteína de baja densidad oxidada

**LPS:** Lipopolisacárido

**M:** Molar



**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógeno

**MCP-1:** Proteína quimioatrayente de monocitos

**MIF:** Mediana de la intensidad de fluorescencia

**MMP:** Metaloproteasa

**NAC:** N-acetilcisteína

**NADPH:** Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato

**NES:** *Nuclear export signal*

**NF-κB:** Factor nuclear κB

**NO:** Óxido nítrico

**NQO1:** NAD(P)H:quinona oxidorreductasa

**Nrf2:** *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

**NSAID:** Fármacos antiinflamatorios no esteroideos

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Ión superóxido

**OH<sup>-</sup>:** Radical hidroxilo

**OLI:** Oligomicina

**PBGD:** Porfobilinógeno deaminasa

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PE:** Ficoeritrina

**PGC-1α:** *(PPAR) gamma coactivator 1*

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**PGES:** Prostaglandina E sintasa

**PQ:** Paraquat

**RANK:** Receptor activador de NF-κB

**RANKL:** Ligando del receptor activador de NF-κB

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RSV:** Resveratrol

**SBF:** Suero bovino fetal

**SOD:** Superóxido dismutasa

**STE:** Tampón NaCl/Tris-Cl/EDTA

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TLR:** *Toll-like receptor*

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**V:** Voltios

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

**vs.:** *Versus*

## INTRODUCCIÓN



## 1. El estrés oxidativo asociado a patologías humanas

La homeostasis celular se puede definir como el conjunto de procesos celulares destinados a mantener estables las condiciones necesarias para el buen funcionamiento de la célula, compensando la variabilidad de las condiciones externas al sistema. La estabilidad de las condiciones se refiere a temperatura, pH, osmolaridad, ratio entre procesos catabólicos y anabólicos, etc.

Asimismo, la homeostasis implica también el mantenimiento de un delicado balance del estado redox (relación entre las formas oxidadas y reducidas de donadores y aceptores de electrones), necesario para el mantenimiento de las funciones celulares normales. Para ello, es necesario que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) se produzca dentro de ciertos límites. Las ROS son moléculas derivadas del oxígeno con uno o más electrones desapareados y que, por tanto, son altamente reactivas pudiendo provocar daños por oxidación en la célula cuando son producidas en exceso. Este daño oxidativo puede conducir a una disfunción celular e incluso llevar a la muerte celular, lo cual a su vez puede derivar en una aceleración del envejecimiento o de enfermedades asociadas al envejecimiento. Por otra parte, las ROS a niveles fisiológicos intervienen en procesos de señalización celular que regulan, entre otras, la respuesta proliferativa (1). Asimismo, las ROS constituyen el principal mecanismo de defensa frente a patógenos (2).

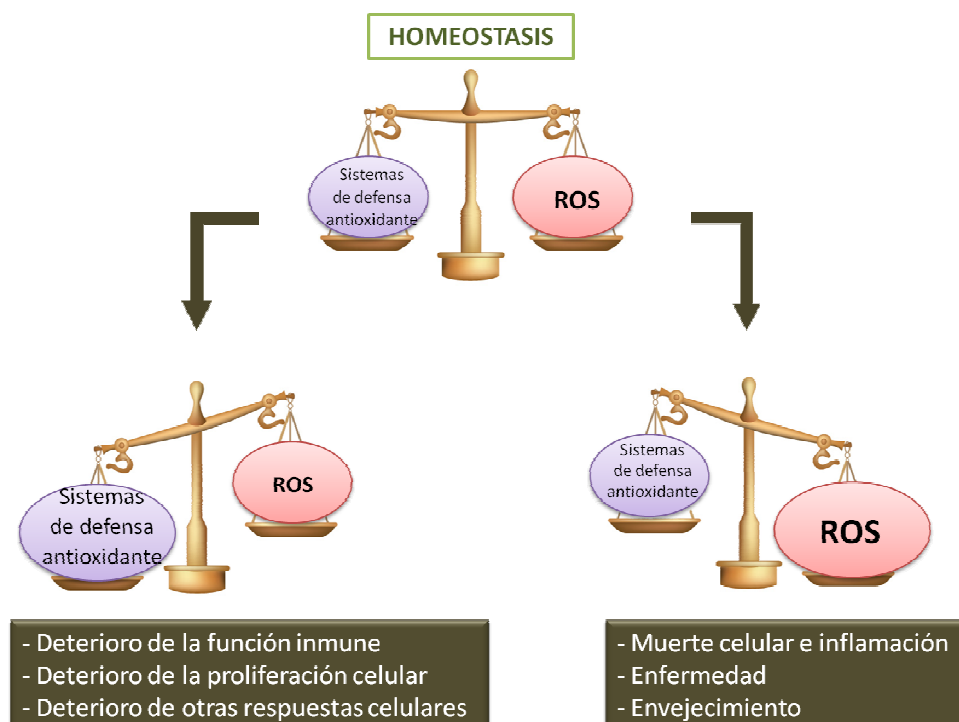
Para contrarrestar los potenciales efectos dañinos de ROS, la célula dispone de sistemas de defensa antioxidante, consistentes en enzimas detoxificadoras que catalizan procesos de conversión de ROS a moléculas menos reactivas, como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), etc; o en pequeñas moléculas antioxidantes que actúan como receptores del electrón desapareado, como la vitamina A, C, E o el glutatión (GSH).

El balance entre la producción de ROS y la defensa antioxidante determinará el grado de estrés oxidativo. El estrés oxidativo en células y tejidos se refiere al desequilibrio entre los niveles de prooxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros. En estas condiciones, ROS pueden modificar lípidos, proteínas y ADN provocando un daño oxidativo.

Este desequilibrio, que tiene como consecuencia el daño oxidativo, puede ser el resultado de distintos factores:

- aumento de la generación de ROS
  - en respuesta a la exposición a toxinas (por ejemplo, el humo de tabaco).
  - como consecuencia de episodios de hipoxia/re-oxigenación.
  - debido a disfunción mitocondrial o a la activación de enzimas endógenas productoras de ROS como la oxidasa del dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato (NADPH oxidasa).
- disminución en los niveles de moléculas o enzimas antioxidantes
  - por disminución en la ingesta de vitaminas u otras moléculas pequeñas antioxidantes, o de los micronutrientes que necesitan las enzimas antioxidantes como cofactores (como Fe, Cu, Zn o Se).
  - por defectos de la maquinaria antioxidante que impide la correcta síntesis del gen antioxidante.

El extremo opuesto, de disminución de los niveles de ROS por debajo del punto de equilibrio homeostático, puede interrumpir la función fisiológica de ROS en diferentes respuestas celulares como la proliferación celular o la función inmune. En este sentido, los individuos con deficiencias hereditarias en algún componente de la NADPH oxidasa (enfermedad crónica granulomatosa) presentan una mayor susceptibilidad a las infecciones, demostrando la importancia de la producción de ROS en la defensa del organismo (3).



**Figura 1: Situaciones de equilibrio y desequilibrio redox.** En una situación de homeostasis celular, existe un equilibrio entre los niveles de prooxidantes (ROS) y de antioxidantes. En este contexto, ROS cumplen funciones fisiológicas y los sistemas de defensa antioxidantes regulan sus niveles para que no se produzca daño oxidativo en las células y tejidos del organismo. Cuando se rompe el equilibrio redox hacia bajos niveles de ROS (izquierda) se crea un estrés reductor (poco común); y cuando el desequilibrio conlleva altos niveles de ROS (derecha) se produce estrés oxidativo (la forma de desequilibrio redox más común en los sistemas biológicos). En ambos casos, se producen efectos perjudiciales para la célula.

El estrés oxidativo está estrechamente relacionado con la inflamación, un proceso que constituye una respuesta adaptativa a cualquier condición percibida como potencialmente peligrosa y que pretende eliminar el peligro, reparar el tejido y restaurar el estado de homeostasis. Son muchas las moléculas endógenas que pueden activar una respuesta inflamatoria (llamadas alarminas o DAMPS, por damage-associated molecular patterns), entre ellas, moléculas oxidadas como por ejemplo la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox), que constituye un mediador clave en el proceso de aterogénesis (4). Estas señales de peligro activan rutas de señalización intracelular, principalmente a través de los receptores de membrana Toll-like receptors (TLRs), que culminan con la activación de factores de transcripción proinflamatorios como el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) o la proteína activadora 1 (AP-1). Estos factores activan la transcripción génica de multitud de mediadores inflamatorios como

interleuquina (IL)-8, IL-1 $\beta$  o factor de necrosis tumoral (TNF) $\alpha$  que, a su vez, pueden activar los TLRs volviendo a activar los factores de transcripción. Los DAMPs también pueden unirse a los receptores citoplasmáticos nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), dando lugar a la activación del inflamasoma, un complejo proteico que promueve la maduración de IL-1 $\beta$  e IL-18, citoquinas que juegan papeles esenciales en el desarrollo de la inflamación.

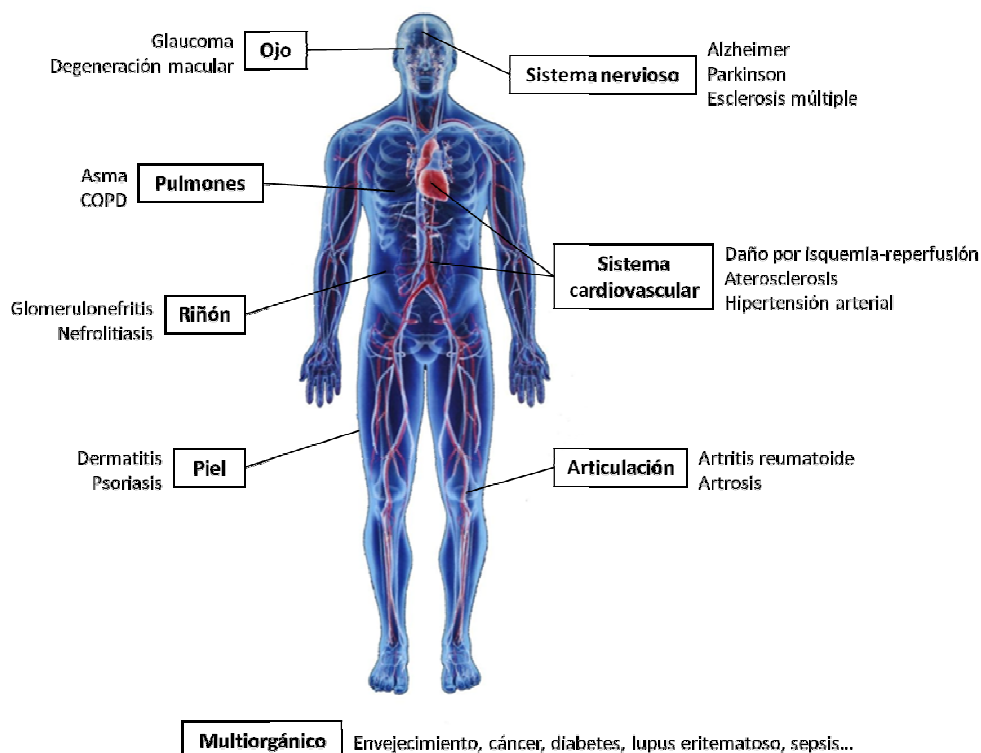
La propia activación de los TLRs puede inducir la formación de más ROS mediada por la mitocondria y la activación de NADPH oxidasas, lo que, a su vez, facilita de nuevo la activación de los TLRs. Como resultado, se crea un ciclo de amplificación progresiva de la respuesta inflamatoria inicial que puede constituir un importante mecanismo en el mantenimiento de la inflamación crónica en muchas enfermedades humanas (5).

Además, la generación mitocondrial de ROS y la liberación de ADN mitocondrial (ADNmt) oxidado por parte de este orgánulo, es un potente activador del inflamasoma, que, como se ha comentado, es un importante mecanismo en la perpetuación de la inflamación (5). Por ello, existe una frecuente asociación entre el daño mitocondrial y enfermedades inflamatorias crónicas y agudas, así como con el proceso de envejecimiento en sí mismo (6).

Así, el estrés oxidativo y la inflamación constituyen dos procesos que se retroalimentan entre ellos, estableciéndose un ciclo vicioso capaz de perpetuar y propagar la respuesta inflamatoria. De hecho, la mayoría de las enfermedades crónicas relacionadas con estrés oxidativo tienen en común que presentan un componente inflamatorio. En estos casos, el proceso de inflamación no alcanza el objetivo de recuperar la homeostasis tisular, sino que el estrés oxidativo perpetúa y amplifica la respuesta inflamatoria hasta convertirse en un proceso patológico crónico. Existe una larga lista de enfermedades que han sido relacionadas con el estrés oxidativo, como son diversas enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, el cáncer, la artritis o incluso el propio proceso de envejecimiento (7-16). Así, en 1956, Harman propone por primera vez la teoría del envejecimiento por radicales libres, que sostiene que el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con el envejecimiento son la consecuencia de la acumulación de daño oxidativo en las moléculas y macromoléculas del organismo (17). En 1972 la teoría se extendió para implicar la producción mitocondrial de ROS (18). En la Figura 2 se



muestran algunas de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, en función del órgano afectado.



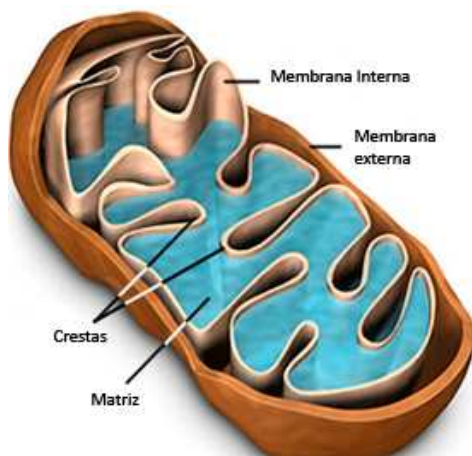
**Figura 2: Ejemplos de enfermedades relacionadas con estrés oxidativo.** En el esquema se muestran algunas de las numerosas enfermedades en las que ha sido descrita la implicación de un incremento del estrés oxidativo en los tejidos afectados. (*COPD, enfermedad pulmonar obstructiva crónica*).

Por todo ello, la conexión entre desequilibrio redox, inflamación y enfermedad conforma un extenso, complejo e interesante campo de estudio.

## 2. Mitocondria y estrés oxidativo

### 2.1. LA MITOCONDRIA

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático presente en casi la totalidad de las células eucariotas en un número variable en función de la demanda energética de cada tejido (desde algunas decenas de mitocondrias por célula hasta varios miles en los tejidos más activos como el hígado o el músculo cardíaco) (19). La mitocondria constituye la principal fuente de energía de la célula. Se caracteriza por poseer dos membranas: una membrana externa, fácilmente permeable a pequeñas moléculas e iones que se mueven libremente a través de canales transmembrana; y una membrana interna, impermeable a la mayoría de las moléculas pequeñas e iones, por lo que presenta transportadores específicos para las moléculas o iones que deben cruzarla. La membrana interna forma numerosas crestas que aumentan la superficie de ésta, permitiendo así albergar una mayor cantidad de los complejos respiratorios que se describirán a continuación.

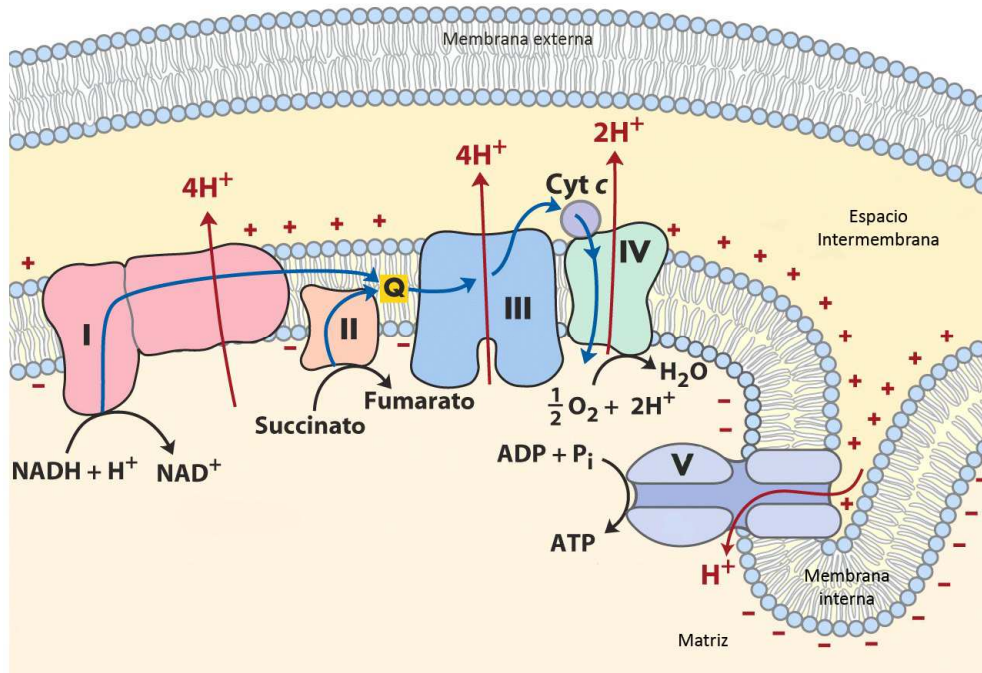


**Figura 3: Estructura y compartimentalización de la mitocondria.** La mitocondria consta de una membrana externa que la recubre, de gran permeabilidad. A continuación, se encuentra la membrana interna, que forma invaginaciones llamadas crestas mitocondriales para aumentar su superficie. El espacio intermembrana juega un importante papel en la creación de gradientes a ambos lados de la membrana interna. Por último, el interior de la mitocondria, la matriz mitocondrial, es la parte soluble que alberga el ADNmt y en la que se llevan a cabo importantes rutas metabólicas. *Adaptado de: [www.biochemden.in/2012/05/biological-oxidation-structure-of.html](http://www.biochemden.in/2012/05/biological-oxidation-structure-of.html)*

Delimitada por la membrana interna se encuentra la matriz mitocondrial, en donde se encuentra embebido el ADNmt y se realizan reacciones metabólicas tan importantes como la oxidación de aminoácidos, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos o el ciclo de Krebs.

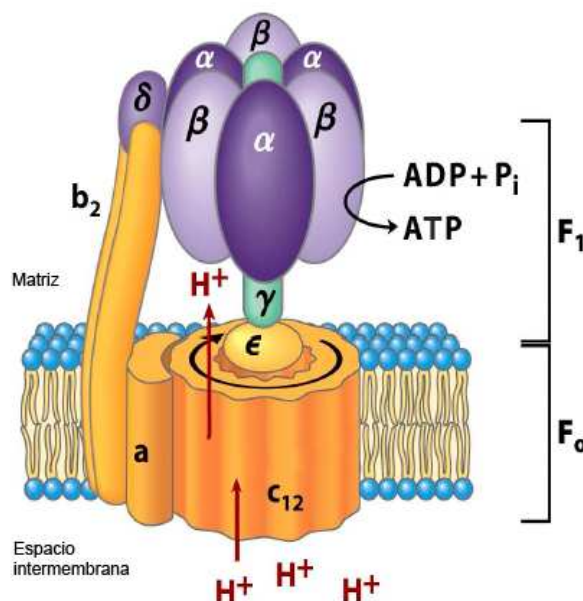
En la membrana interna se encuentra la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), un conjunto de 4 complejos multiproteicos entre los que se realiza el proceso de transporte electrónico: el complejo I o NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) deshidrogenasa, el complejo II o succinato deshidrogenasa, el complejo III o ubiquinona-citocromo c oxidorreductasa y el complejo IV o citocromo oxidasa. A continuación se encuentra la ATP sintasa, otro complejo multiproteico (a menudo considerado como el complejo V de la CRM) que lleva a cabo la síntesis del ATP. Todos estos complejos proteicos participan en el proceso denominado fosforilación oxidativa, que culmina con la reducción del  $O_2$  para formar  $H_2O$  y con la síntesis de ATP.

El proceso de fosforilación oxidativa puede consumir aproximadamente el 85% del  $O_2$  usado por la célula y generar hasta el 90% del ATP producido en ésta (20). Este proceso comienza con la captación de electrones provenientes del NADH y de la oxidación de succinato a fumarato. Estos electrones son canalizados secuencialmente a través de los complejos I, II, III y IV hasta que se transfieren al  $O_2$ , al tiempo que los complejos I, III y IV transportan activamente protones ( $H^+$ ) hacia el espacio intermembrana. Debido a la naturaleza impermeable de la membrana mitocondrial interna, este transporte de  $H^+$  establece un gradiente electroquímico entre el espacio intermembrana y la matriz (debido a una diferencia en la concentración de  $H^+$  y una diferencia en la carga eléctrica a ambos lados de la membrana). La energía potencial almacenada en forma de este gradiente electroquímico, llamada fuerza protón-motriz, impulsará un flujo de retorno de  $H^+$  hacia la matriz, a favor de gradiente, a través de la ATP sintasa. La ATP sintasa utiliza este flujo pasivo de  $H^+$  para producir ATP mediante la adición de un grupo fosfato ( $P_i$ ) a una molécula de ADP (Figura 4).



**Figura 4: La fosforilación oxidativa.** La fosforilación oxidativa consta de 2 procesos acoplados. Primero, tiene lugar la transferencia electrónica a través de los complejos de la CRM. Los complejos I y II catalizan la transferencia de electrones procedentes del NADH y de la oxidación del succinato, respectivamente, a la ubiquinona (Q), que se reduce a ubiquinol (QH<sub>2</sub>). El ubiquinol difunde por la membrana lipídica hasta el complejo III, que transporta los electrones del QH<sub>2</sub> al citocromo c (Cyt c). El complejo IV completa la secuencia transfiriendo los electrones desde el Cyt c al aceptor último del proceso, el O<sub>2</sub>, que se reduce para formar H<sub>2</sub>O. Los complejos I, III y IV utilizan la energía de la transferencia electrónica para bombear protones (H<sup>+</sup>) de la matriz hacia el espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico a ambos lados de la membrana interna. En segundo lugar, la ATP sintasa o complejo V utiliza el flujo pasivo de H<sup>+</sup> hacia la matriz para catalizar la formación de ATP. *Modificado de Principios de Bioquímica (4ª Ed.) Lehninger.*

La ATP sintasa mitocondrial, o complejo V de la CRM, es una ATPasa de tipo F (con un dominio integral de membrana Fo y un dominio periférico F1 hacia el que se dirigen los H<sup>+</sup>). Usa el gradiente de H<sup>+</sup> para llevar a cabo la síntesis de ATP y acopla estos dos acontecimientos mediante un mecanismo llamado catálisis rotacional. En la Figura 5 se muestra la estructura de la ATP sintasa mitocondrial.



**Figura 5: Estructura de la ATP sintasa mitocondrial.** La ATP sintasa, o complejo V de la CRM, consta de dos dominios: el dominio  $F_0$ , integrado en la membrana mitocondrial interna y el dominio  $F_1$ , dispuesto hacia la matriz.  $F_0$  funciona como canal de protones mientras que  $F_1$  conforma la subunidad catalítica, responsable de la conversión de  $ADP + P_i$  a ATP. Cuando un  $H^+$  se une a  $F_0$  provoca cambios en su conformación que provocan que sus subunidades roten. Esta rotación se transmite al dominio  $F_1$  permitiendo así la liberación de una molécula de ATP. Este mecanismo se denomina catálisis rotacional.

## 2.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR

### 2.2.1. Producción de especies reactivas de oxígeno

La mitocondria es una de las principales fuente celulares de ROS (21). Durante el proceso de transporte electrónico a través de la CRM, un pequeño porcentaje (menos de un 5%) de los electrones que fluyen a través de los complejos desde el NADH o el succinato, escapa y se une directamente al  $O_2$  formando el ión superóxido ( $O_2^-$ ) (22). La formación de  $O_2^-$  tiene lugar principalmente en los complejos I y III (21). Estos radicales no difunden fácilmente a través de las membranas, por lo que ejercen más daño cerca de su origen, provocando la oxidación de proteínas mitocondriales y del ADNmt. El  $O_2^-$  además puede ser enzimáticamente transformado por la SOD en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este intermediario difunde con gran facilidad a través de la membrana, pudiendo ejercer su poder oxidante en proteínas y lípidos de toda la célula. El  $H_2O_2$ , a su vez, puede ser parcialmente reducido al radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), uno de los

oxidantes más fuertes de la naturaleza; o bien, ser metabolizado por otras enzimas antioxidantes, como la CAT o la GPx, para rendir  $O_2$  y  $H_2O$ . Además, el  $O_2^-$  también puede reaccionar con el óxido nítrico (NO) formándose otro oxidante de gran importancia, el peroxinitrito (23).

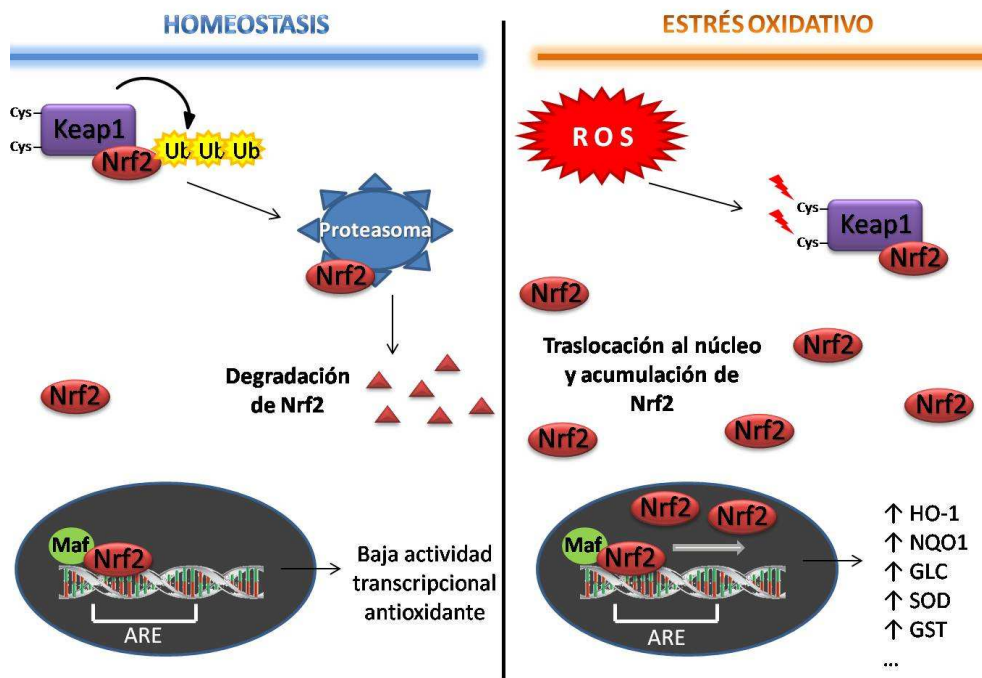
### **2.2.2. El daño oxidativo**

Como se ha destacado anteriormente, las ROS tienen un papel esencial en la defensa del organismo y en la señalización de rutas como la proliferación celular, por lo que la generación de ROS dentro de ciertos límites es esencial para el mantenimiento de la homeostasis. Así, en estado basal sin estrés oxidativo, los sistemas antioxidantes se mantienen en niveles adecuados de expresión para mantener los niveles de ROS a niveles no tóxicos. Sin embargo, cuando las ROS son producidas en exceso y los sistemas antioxidantes no pueden mantener el equilibrio, se pueden provocar graves daños en lípidos, proteínas o ácidos nucleicos por oxidación. El ADNmt es especialmente sensible a mutaciones provocadas por ROS debido a su proximidad al lugar de formación de ROS y a la ausencia de histonas protectoras. El ADNmt codifica para 13 polipéptidos que forman parte de complejos de la cadena de transporte electrónico, por lo que mutaciones en el ADNmt pueden comprometer el correcto funcionamiento de la mitocondria. Además, la ATP sintasa, así como otras enzimas de la cadena de transporte electrónico, ha demostrado ser sensible a la inactivación por estrés oxidativo (24). Estos eventos pueden derivar en un deterioro de la función mitocondrial, lo que a su vez produce un incremento en la producción de ROS, iniciándose un ciclo vicioso de colapso mitocondrial.

### 3. Los sistemas de defensa antioxidante. El factor de transcripción Nrf2

Los sistemas de defensa antioxidante son necesarios para contrarrestar los excesos de ROS, que pueden provocar graves daños en el organismo. Así, las células disponen de moléculas antioxidantes y enzimas detoxificantes que pueden eliminar o detoxificar rápidamente los radicales libres. El GSH es la molécula pequeña antioxidante más abundante. Las enzimas detoxificantes incluyen SOD, GPx, glutatión-S-transferasas (GSTs), CAT, glutatión reductasa, glutamato cisteín ligasa (GCL), NAD(P)H:quinona oxidorreductasa (NQO1), hemoxygenasa-1 (HO-1), y otras enzimas detoxificantes de fase II (25).

El factor de transcripción que regula la expresión de las enzimas detoxificantes de fase II para conseguir una respuesta rápida y eficaz frente a un estrés oxidativo es Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). De hecho, regula la expresión de más de 200 genes implicados en la defensa antioxidante (26). En condiciones basales, Nrf2 se encuentra unido a su represor, Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Keap1 induce la ubiquitinización, y subsecuente degradación por el proteasoma, de Nrf2. Así, bajo condiciones sin estrés, Nrf2 es degradado rápidamente, presentando una vida media de 13 – 21 minutos, por lo que los niveles basales de Nrf2 se mantienen bajos. Cuando se produce un aumento en los niveles intracelulares de ROS, los residuos cisteína de Keap1 se oxidan, provocando modificaciones en la proteína que resultan en una menor capacidad para provocar la degradación de Nrf2. De esta manera, bajo condiciones de estrés oxidativo Nrf2 ve aumentada su vida media hasta 100 – 200 minutos. Además de Keap1, Nrf2 también dispone de un sensor del estado redox: su dominio NES (*nuclear export signal*). Este dominio promueve la salida de Nrf2 del núcleo en condiciones sin estrés, mientras que ve debilitada su actividad en condiciones oxidativas, por lo que Nrf2 es retenido en el núcleo. Por lo tanto, cuando existe un aumento de ROS, la actividad transcripcional de Nrf2 aumenta gracias a su mayor acumulación en el núcleo debido en primer lugar a su abundancia y en segundo lugar a su retención en el núcleo (25). Una vez en el núcleo, Nrf2 se une a las regiones ARE (elementos de respuesta antioxidante, por sus siglas en inglés) presentes en los promotores de todos los genes relacionados con este factor, iniciando así su transcripción.



**Figura 6: Mecanismo de regulación y activación de Nrf2.** La actividad transcripcional de Nrf2 se encuentra regulada mediante diversas vías. El principal regulador es Keap1, una proteína citosólica rica en residuos cisteína de unión a Nrf2 y que funciona como sensor del estado redox celular. En el núcleo, Nrf2 se une a la proteína Maf y el dímero formado puede entonces unirse a la secuencia ARE (*Antioxidant Response Element*) en la región promotora de los genes antioxidantes y comenzar su transcripción. La dimerización con Maf es esencial para la actividad transcripcional de Nrf2, y esta pequeña proteína puede estar secuestrada por proteínas inhibitoras como Bach1; por ello Maf se puede considerar otro regulador transcripcional de Nrf2. En condiciones homeostáticas, Keap1 provoca la ubiquitinización de Nrf2 y su posterior degradación por el proteasoma. Esto conlleva la disminución de la vida media de Nrf2 y su abundancia en el núcleo, limitando así su actividad transcripcional. Sin embargo, en condiciones oxidativas, los residuos cisteína de Keap1 son oxidados y provocan la pérdida de capacidad de esta proteína para inducir la ubiquitinización de Nrf2. Como resultado, Nrf2 se hace más abundante gracias al aumento de su vida media. Además, su retención en el núcleo es mayor, y en conjunto se produce un aumento de la actividad transcripcional de Nrf2 y, por consiguiente, de sus productos génicos (HO-1, NQO1, GLC, SOD, GST, etc).

Además, la actividad de ciertas enzimas antioxidantes como GCL también es modulada directamente por ROS (las propias proteínas poseen sensores redox). Esta vía proporciona una respuesta más rápida al daño por no implicar transcripción génica (25).

Por todo ello, Nrf2 juega un papel de gran relevancia en la protección del organismo frente al estrés oxidativo atenuando la patogénesis asociada a la inflamación como en artritis reumatoide, aterosclerosis, asma, etc (27).



### 3.1. Nrf2 EN EL ENVEJECIMIENTO

En animales jóvenes, un incremento en la producción de ROS viene inmediatamente acompañado de una respuesta adaptativa del sistema Nrf2/ARE, que se activa e incrementa la expresión de genes antioxidantes para hacer frente al estrés oxidativo. Una de las características principales del envejecimiento es el incremento en la producción celular de ROS, tanto de origen mitocondrial como de otras fuentes, como las NADPH oxidasas. Sin embargo, a pesar del incremento de ROS con la edad, no llega a desencadenarse una respuesta adaptativa eficaz del sistema antioxidante. De hecho, se ha observado un deterioro de la función de Nrf2 en el envejecimiento y en enfermedades relacionadas con el mismo, como en enfermedades neurodegenerativas o en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (28, 29). Este declive de la función de Nrf2 con el envejecimiento puede ser el resultado de mutaciones somáticas de pérdida de función en los genes codificantes de Nrf2 o Mafs; de modificaciones epigenéticas del promotor de NRF2 que reduzcan su expresión; o de variaciones en la abundancia o actividad de otros factores que regulan la actividad de Nrf2, de ARE o de ambos (quinasas, fosfatasa o proteínas de unión a ADN) (28). Además, la expresión de Keap1 se encuentra aumentada durante el envejecimiento, contribuyendo así a la desregulación de la función de Nrf2.

## 4. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad articular autoinmune de etiología desconocida con un marcado carácter inflamatorio y asociada a un incremento en el estrés oxidativo. Se trata de una artritis poliarticular de distribución simétrica, es decir, que afecta a varias articulaciones de ambos lados del cuerpo. Principalmente, afecta a las pequeñas articulaciones diartroidales de las manos y pies y a las rodillas. Presenta un curso crónico, con tendencia a una progresiva destrucción y deformidad articular (30, 31). Las articulaciones afectadas sufren hipertrofia e hiperplasia sinovial, neoangiogénesis y destrucción de cartílago y hueso.

La epidemiología de la AR varía en gran medida en función de etnias o regiones geográficas, sin embargo se estima que afecta al 0.5 – 1 % de la población mundial adulta, siendo unas 3 veces más frecuente en mujeres, lo que sugiere un papel para las hormonas sexuales (32). Debido a la cronicidad de la enfermedad y la comorbilidad asociada, a su elevada incidencia en la población y a la grave incapacidad que provoca en los pacientes que la padecen, la AR presenta un importante impacto socioeconómico. La Sociedad Española de Reumatología estima el gasto sanitario necesario por cada paciente (se calculan aproximadamente 200.000 personas con AR en España) entre 3.000 y 7.000 euros anuales, aunque estudios internacionales sitúan la cifra en más de 15.000 euros anuales por paciente (33). En cualquier caso, el impacto económico en la sociedad y, especialmente, la gran reducción en la calidad de vida de los pacientes reflejan la importancia del estudio de esta enfermedad.

### 4.1. POSIBLE ETIOLOGÍA DE LA AR

Aunque la etiología de la AR todavía se escapa a la completa comprensión por parte de la comunidad científica, se especula que probablemente se trate del resultado de una compleja interacción de genes de susceptibilidad, factores ambientales y cambios somáticos que se producen con el tiempo en ciertas células (fibroblastos, macrófagos, células T y células B) (31).

Respecto al factor genético de la enfermedad, presenta una herencia compleja probablemente oligogénica. Se han identificado más de 150 genes relacionados con la AR. Este factor genético explicaría algo más del 50% de la susceptibilidad para el desarrollo de la

enfermedad. Entre los factores genéticos mejor descritos en AR destacan los alelos del sistema HLA, en particular el aloantígeno HLA-Dw4/DR4 (antígeno HLA de clase II, HLA-DR4) que participa en la presentación de péptidos al receptor de célula T (lo que le confiere gran importancia en el desencadenamiento de la respuesta inmune) (31).

Otros factores implicados en el desarrollo de AR son factores ambientales (bacterias, virus, superantígenos), inmunológicos (autoantígenos, colágeno tipo II, péptidos inmunogénicos del cartílago) y neuroendocrinos (respuesta defectuosa a cortisol, favoreciendo la inflamación crónica) (31), que incidirían sobre individuos genéticamente predispuestos. El tabaquismo, por su parte, ha demostrado ser un importante factor de riesgo para el desarrollo y la actividad de la enfermedad (34, 35).

A mediados del siglo XX se descubrió la primera evidencia de autoinmunidad en la AR con la identificación del “factor reumatoide” (FR) en sueros de pacientes. Aproximadamente el 80% de los pacientes AR son seropositivos para FR. Éste es un autoanticuerpo que induce la formación de complejos inmunes al unirse con la porción Fc de las inmunoglobulinas y cuya presencia predice un curso más agresivo y destructivo de la enfermedad (30). Sin embargo, su presencia no es específica de AR. Otros anticuerpos, los anti-péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) están presentes aproximadamente en un 50% de los pacientes con AR, pero pueden ser más específicos de la enfermedad, presentando importantes características diagnósticas y predictivas (36).

## 4.2. EL TEJIDO SINOVIAL

### 4.2.1. El tejido sinovial normal

La AR se caracteriza principalmente por una alteración de la morfología, composición y función del tejido sinovial. Este tejido reviste el interior de la cápsula articular y produce el líquido sinovial, que lubrica la articulación y proporciona nutrición al cartílago adyacente. El tejido sinovial se compone de dos capas bien diferenciadas, que en condiciones normales presentan la siguiente estructura:

- Capa íntima (*lining*): Bordea el tejido sinovial y está en contacto directo con la cavidad intraarticular, donde se encuentra el líquido sinovial. Presenta de 1 a 3 capas celulares (20-40

μm) organizadas de forma laxa, sin vasculatura ni membrana basal. Está compuesta por 2 tipos celulares: sinoviocitos tipo A (con características de macrófagos derivados de la médula ósea) y sinoviocitos tipo B (con características morfológicas y funcionales de fibroblastos) (31). Estos últimos son los más abundantes, constituyendo dos tercios de todos los sinoviocitos que se encuentran en la sinovial (37). En condiciones normales, los sinoviocitos tipo fibroblasto proporcionan proteínas plasmáticas y moléculas lubricantes, como el ácido hialurónico, a la cavidad articular y al cartílago adyacente (38).

- Capa subíntima (*sublining*): Consiste en un tejido conjuntivo laxo que presenta pocas células, con una organización todavía más laxa, algunos vasos sanguíneos, adipocitos y fibroblastos. En su zona superior se encuentran pequeños capilares o vénulas, y vasos de mayor calibre en las zonas más profundas. En esta zona aparecen algunos macrófagos y linfocitos. La matriz extracelular se compone de colágeno, fibronectina y proteoglicanos (31).

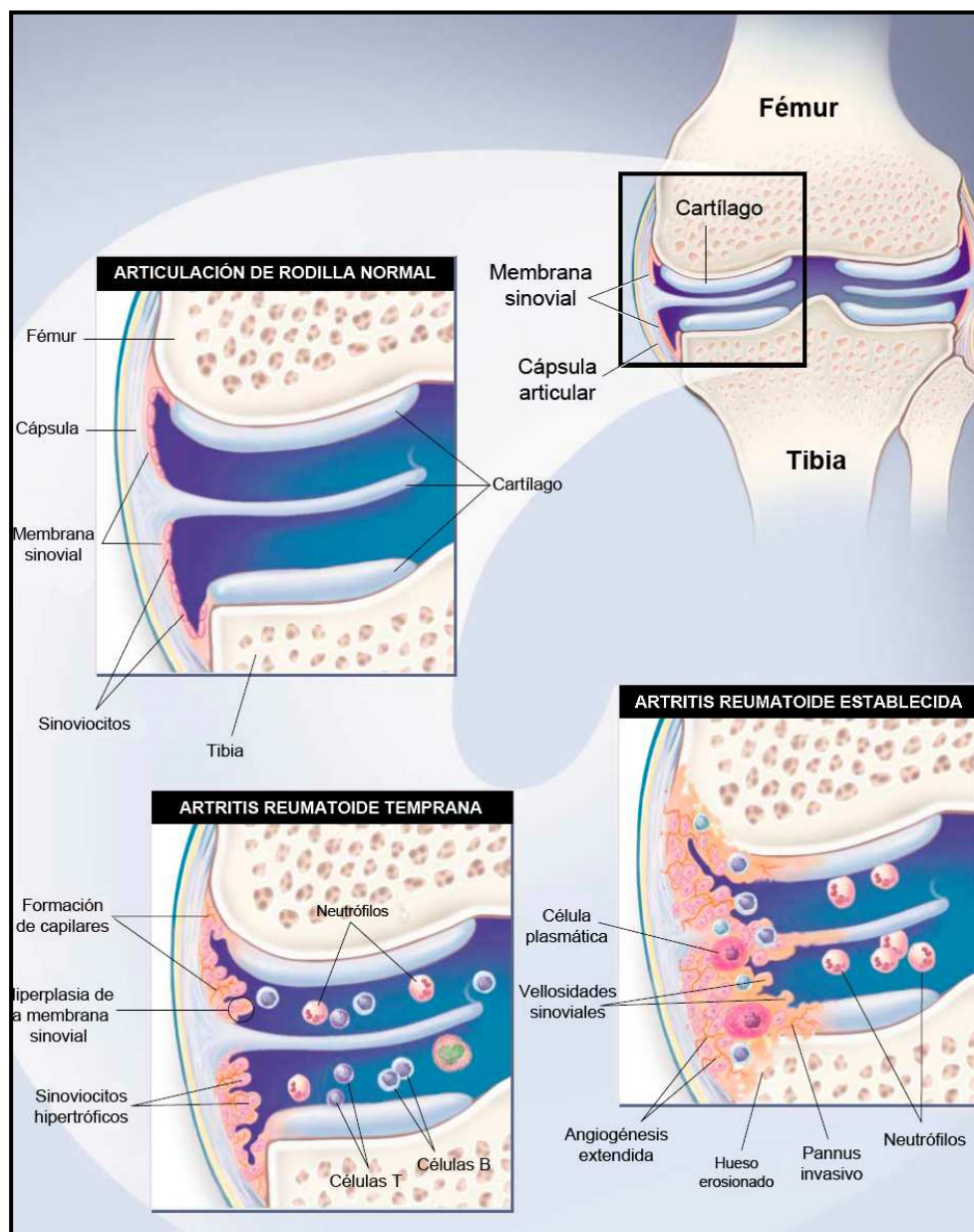
#### **4.2.2. El tejido sinovial reumatoide**

Durante el desarrollo de la enfermedad reumatoide, la membrana sinovial sufre cambios estructurales de gran magnitud. Se produce un aumento en masa, con edema, pliegues redundantes y vellosidades (31).

En fases iniciales de la enfermedad, en la sinovial se observa edema tisular, proliferación vascular e hiperplasia sinovial, con discreta infiltración difusa de la subíntima por linfocitos y neutrófilos (31). Las células T CD4<sup>+</sup> activadas por antígeno llegan a la sinovial y, además de producir citoquinas proinflamatorias, amplifican la respuesta inmune estimulando otras células no residentes (células B, monocitos, macrófagos) así como a las células residentes (sinoviocitos, condrocitos y osteoclastos). Estas células activadas inducirán la liberación de citoquinas, especialmente TNFα, IL-1β e IL-6, causando inflamación sinovial y daño articular. El daño articular resulta de la degradación de tejido conectivo por las metaloproteasas (MMPs) (especialmente estromelisina y colagenasas), y de la estimulación de la osteoclastogénesis por células T CD4<sup>+</sup> activadas (39).

En la enfermedad establecida se intensifica la hiperplasia e hipertrofia sinovial, llegando la íntima a tener un grosor de hasta 10 – 15 capas celulares (37). Además, los sinoviocitos AR presentan un fenotipo agresivo que contribuyen activamente en los mecanismos de la

enfermedad, promoviendo la inflamación, la degradación del cartílago y del hueso y la formación del *pannus* (40). El *pannus* es una región de la membrana sinovial reumatoide que limita con el cartílago y el hueso subcondral, invade dichas estructuras y produce las características erosiones marginales de la AR. Se compone básicamente de sinoviocitos tipo fibroblasto de la íntima con algunos linfocitos de la subíntima (31).



**Figura 7: Evolución de la patogénesis de la AR en la articulación de la rodilla.** En una articulación normal, la sinovial presenta 1-3 capas de sinoviocitos sobre una capa de tejido conectivo laxo. En la AR temprana la sinovial se engruesa por hiperplasia e hipertrofia. Se comienza a formar una red de nuevos vasos sanguíneos, provocando la infiltración de la sinovial y el líquido sinovial con células T (predominantemente CD4+) y células B. En el líquido sinovial también se acumula una gran cantidad de neutrófilos. En la AR establecida, la sinovial sufre la transformación al tejido inflamatorio invasivo llamado *pannus*, que invade y destruye el cartílago y el hueso adyacente. *Adaptado de Choy E.H., 2001 (41).*

En las fases más avanzadas de la enfermedad, la subíntima muestra una gran infiltración de células mononucleares, en las que predominan linfocitos T, aunque también abundan linfocitos B, macrófagos y células plasmáticas (31). La mayoría de los linfocitos T están activados y presentan una disposición perivascular (31). Los neutrófilos se acumulan en el líquido sinovial, en donde captan complejos inmunes y liberan enzimas proteolíticas (30).

#### 4.3. LOS SINOVIOCITOS

Los sinoviocitos normales (en adelante nos referiremos a sinoviocitos como los sinoviocitos tipo fibroblasto) secretan altos niveles de ácido hialurónico a la cavidad articular, que posee propiedades lubricantes e inmunomoduladoras, y componentes de tejido conectivo para el mantenimiento de la cápsula articular (fibronectina, colágeno tipo IV y tipo VI, laminina, proteoglicanos, fibrilina). También controlan el volumen de líquido sinovial en la articulación (37).

Los sinoviocitos AR sufren una transformación hacia un fenotipo agresivo inflamatorio, que resulta, al menos en parte, de mutaciones somáticas o alteraciones epigenéticas (40). Estos sinoviocitos transformados presentan la capacidad de sobrevivir a un ambiente rico en factores inductores de apoptosis como ROS o citoquinas; presentan una elevada expresión de oncogenes y elevada síntesis de MMPs, una mayor capacidad de migración e invasividad, una reducida inhibición por contacto y un crecimiento “anclaje-independiente”. Todo ello les confiere una apreciable similitud a células tumorales cuya principal característica es su crecimiento invasivo hacia los tejidos adyacentes (40, 42). La morfología y las características biológicas de los sinoviocitos transformados difieren en gran medida de los sinoviocitos normales, poseyendo los primeros una forma más redondeada y un gran núcleo con nucleolo prominente (42).

Los sinoviocitos AR también están implicados en la osteoclastogénesis (erosión del hueso marginal), mediante la secreción de citoquinas, como el RANKL (ligando del receptor activador de NF- $\kappa$ B), que inducen la diferenciación de macrófagos a osteoclastos. Además, también se ha demostrado que pueden directamente invadir el hueso (aunque en un proceso más lento que la erosión mediada por osteoclastos, pero que puede ser de relevancia fisiológica igualmente) (37).

Los sinoviocitos en los lugares de invasión o de la íntima secretan grandes cantidades de MMPs y catepsinas, conduciendo a la degradación de tejido conectivo, cartílago y hueso, y activando otras proteasas. Debido a la potencia de los sinoviocitos para producir enzimas degradadoras de cartílago y hueso y su efecto estimulador sobre los osteoclastos, los sinoviocitos constituyen la principal célula efectora de la activación y estimulación de los osteoclastos, lo que deriva en el principal problema de la AR: la destrucción articular (37, 38, 42).

También es importante destacar que los sinoviocitos AR expresan mutaciones promitóticas y antiapoptóticas; si estas mutaciones son una causa o una consecuencia de la enfermedad, sigue siendo objeto de conjetura (37).

#### **4.3.1. Sinoviocitos e inflamación**

Los sinoviocitos producen y también responden a una amplia variedad de mediadores inflamatorios como las citoquinas IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF $\alpha$  o IFN- $\gamma$  (interferón- $\gamma$ ); la iNOS (enzima sintasa de óxido nítrico inducible); factores de crecimiento como el GM-CSF (factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos) o el TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ ); prostaglandinas como la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>); varias quimioquinas como IL-8, etc (30, 37).

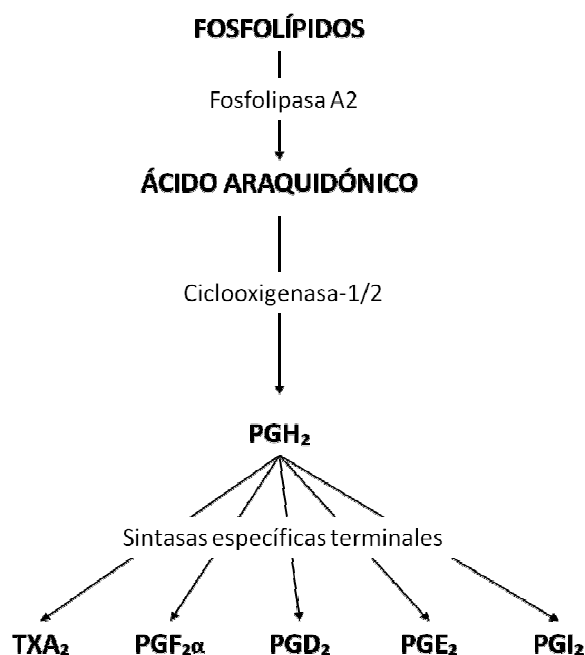
TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , dos de las citoquinas más abundantes en la articulación AR, parecen actuar de forma sinérgica para inducir la función efectora (30, 31, 43). De hecho, los agentes biológicos más utilizados en el tratamiento de la artritis son los inhibidores del TNF $\alpha$  (Adalimumab, Etanercept, Infliximab o certolizumab) o, más recientemente, el antagonista de la IL-1 $\beta$  (Anakinra). Se postula que la IL-1 $\beta$  es responsable de la inducción de la inflamación en las fases más tempranas de la enfermedad, mientras que TNF $\alpha$  ejercería su efecto en las etapas posteriores de establecimiento de la enfermedad (44).

La IL-1 $\beta$  es una citocina que se sintetiza como un precursor de 31 kDa (pro-IL-1 $\beta$ ) y que es escindida por la caspasa-1 a la forma madura de 17 kDa. Como se ha comentado anteriormente, ejerce sus efectos desde la fase más temprana de la enfermedad, siendo de gran importancia en el desarrollo de ésta. En este sentido, junto con IL-6, parece ser la principal citocina responsable del establecimiento de la inflamación en la articulación AR. Así, cuando IL-1 $\beta$  se une a sus receptores (IL-1R) estimula su propia síntesis y la síntesis de una gran variedad de mediadores inflamatorios como IL-17, IL-8, IL-6, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos), etc. Sus efectos biológicos pueden ser controlados por inhibidores naturales, como el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), al que se une la IL-1 $\beta$  sin llegar a desencadenar la ruta de señalización (45). Sin embargo, en pacientes AR parece existir un desequilibrio entre la producción de IL-1 $\beta$  y de IL-1Ra, de manera que la producción de este último no es suficiente para bloquear la actividad de IL-1 $\beta$  (46).

Uno de los mediadores inflamatorios que se ve incrementado en respuesta a la señalización por IL-1 $\beta$  es la enzima ciclooxigenasa (COX)-2. La enzima COX presenta dos isoformas: COX-1 (69 kDa), que se expresa de manera constitutiva en la célula, y COX-2 (72 kDa), la isoforma inducible. La expresión de la enzima COX-2 se ve intensamente incrementada en los sinoviocitos y vasos sanguíneos del tejido sinovial AR. La importancia de esta enzima en la patogénesis de la AR radica en su participación en la ruta de síntesis de la PGE<sub>2</sub> (47).

La síntesis de PGE<sub>2</sub> es consecuencia de una serie de reacciones enzimáticas (Figura 8) que incluyen la liberación de ácido araquidónico por la fosfolipasa A2 y su conversión a PGH<sub>2</sub> por COX-1 y COX-2. Por último, la PGE sintasa (PGES) realiza la conversión de PGH<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub> (48).





**Figura 8: Cascada de reacciones para la síntesis de prostaglandinas.** La liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana y su conversión hasta  $\text{PGH}_2$  tiene lugar mediante una serie de reacciones enzimáticas que involucran a la fosfolipasa A2 y a la ciclooxygenasa-1/2. Desde este sustrato, sintetas específicas terminales se encargan de la conversión a las distintas prostaglandinas. La  $\text{PGH}_2$  es convertida a  $\text{PGE}_2$  mediante la PGE sintasa, que puede ser citosólica (constitutiva) o microsomal (inducida).

$\text{IL-1}\beta$  es capaz de inducir la expresión de COX-2, además de otras enzimas involucradas en la síntesis de  $\text{PGE}_2$  como la PGES microsomal (48). Las prostaglandinas son moléculas de vida corta que son secretadas y ejercen señales autocrinas o paracrin, actuando de manera similar a hormonas. En las artritis inflamatorias, la  $\text{PGE}_2$  juega un papel de gran importancia, ya que es la principal causante del dolor, amplifica la señal inflamatoria al inducir la síntesis de  $\text{IL-1}\beta$ , y es responsable de la degradación del cartílago (induciendo, por ejemplo, la producción de MMPs) y del hueso (mediante la inducción de osteoclastogénesis) (47). También está implicada en el proceso de angiogénesis, actuando como inductora de la expresión de VEGF en los sinoviocitos. Además, la  $\text{PGE}_2$  promueve la expresión de  $\text{IL-1}\beta$ , amplificando el proceso inflamatorio (49).

$\text{IL-1}\beta$  también estimula la síntesis de quimioquinas, como la IL-8. Las quimioquinas son una familia de citoquinas proinflamatorias de bajo peso molecular, que ejercen acciones quimioatrayentes. En AR las quimioquinas juegan un papel crucial en la iniciación y mantenimiento de la inflamación al inducir la quimiotaxis y migración de los leucocitos a través

de la barrera endotelial hasta la sinovial. IL-8 se encuentra sobreexpresada en el tejido sinovial, líquido sinovial y suero de pacientes AR en correlación con la actividad de la enfermedad (50). Al contrario que los macrófagos, que parecen liberar IL-8 de manera constitutiva, los sinoviocitos sólo producen IL-8 en presencia de inductores como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , productos virales o bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) o al estrés celular, todos ellos importantes en la patología AR (51). Probablemente las acciones más importantes de IL-8 en la articulación sean su inducción de la angiogénesis y su acción quimiotáctica sobre neutrófilos, la principal célula inmune presente en el líquido sinovial AR (50). Además, junto con IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , mantiene el proceso inflamatorio en la articulación reumatoide provocando la quimiotaxis y expansión de macrófagos y células T, así como participando en la activación de los sinoviocitos AR (42).

#### **4.3.2. Sinoviocitos y angiogénesis**

La angiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, es muy activa en AR, particularmente en la enfermedad de inicio temprano. Los nuevos vasos proporcionan los medios para el reclutamiento de células inflamatorias a la cavidad articular, así como oxígeno y nutrientes a la sinovial hiperplásica. Generalmente, la angiogénesis está estrechamente regulada por inductores e inhibidores. En estado basal, el endotelio vascular es quiescente, y menos de un 0.01% de las células endoteliales se dividen. En procesos benignos (como la reparación de heridas) o patológicos (como el crecimiento tumoral y la AR), el tejido vascular puede ser rápidamente estimulado para proliferar. Muchos factores angiogénicos incluyendo citoquinas, factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias, y moléculas de adhesión solubles han sido descritos en la sinovial y en el líquido sinovial de pacientes con AR. Sin embargo, estos tejidos también contienen inhibidores de la angiogénesis por lo que no está claro todavía si el incremento neto en el volumen vascular de las articulaciones de pacientes con AR resulta de una sobreabundancia de factores angiogénicos o un déficit de factores angiostáticos (o ambos) (43). Además, se ha demostrado que una significativa proporción de los vasos sanguíneos presentes en la sinovial AR son inmaduros o inestables (52, 53). La estabilización o maduración del vaso depende de la adquisición de una capa de pericitos que rodean al vaso, y de la interacción de las células endoteliales del nuevo vaso con dichos pericitos y los componentes de la matriz extracelular perivascular, a la que debe anclarse. De hecho, se ha demostrado que los

tratamientos actuales anti-TNF efectivos en el tratamiento de la AR disminuyen el porcentaje de vasos inmaduros en la sinovial (53).

Los sinoviocitos AR también contribuyen al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos mediante la secreción de factores proangiogénicos como FGF (factor de crecimiento fibroblástico), VEGF, IL-18 y angiopoyetinas (37). Se ha detectado una sobreexpresión de VEGF en suero, líquido sinovial y tejido sinovial de pacientes AR (54).

Todos los tejidos, especialmente aquellos que están creciendo durante un extenso período de tiempo como la sinovial AR, necesitan un suministro adecuado de oxígeno y nutrientes. Para ello, es esencial la angiogénesis en la articulación AR. Uno de los factores desencadenantes parece ser la hipoxia, que estimula tanto factores proangiogénicos como factores quimiotácticos, MMPs y factores osteoclastogénicos. Las citoquinas proinflamatorias abundantes en la sinovial AR como  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{TGF-}\beta$  pueden inducir la expresión de factores proangiogénicos en sinovios AR como la angiopoyetina-1 Y VEGF, funcionando además como un factor aditivo en condiciones de hipoxia (38, 55).

#### **4.4. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN EN AR**

Las células presentes en la región inflamada están expuestas a una gran cantidad de estímulos inflamatorios, aunque sólo unos pocos factores de transcripción parecen estar involucrados en su regulación. NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción clave en AR y se sabe que juega un papel decisivo tanto en etapas iniciales de la enfermedad como en el estado de perpetuación de la inflamación crónica. Regula la expresión de más de 150 genes que coinciden con los principales mediadores de la patología AR entre los que se encuentran citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, prostaglandinas y otros (56). La activación de NF- $\kappa$ B también tiene efectos antiapoptóticos, contribuyendo de esta manera a la hiperplasia sinovial que caracteriza la AR. Además, modula la expresión de MMPs, sugiriendo que puede regular la destrucción articular (37). Algunos de los genes diana más importantes de NF- $\kappa$ B se muestran en la Tabla 1. A su vez, la activación de NF- $\kappa$ B es inducida por una variedad de señales entre las que destacan citoquinas (IL-1,  $\text{TNF}\alpha$ ), RANKL, factores de crecimiento (PDGF, bFGF), proteínas víricas, productos bacterianos (LPS) y estrés oxidativo.

Inflamación	Reclutamiento de células inflamatorias	Neovascularización	Producción de PGs y NO	Remodelado tisular	Proliferación	Antiapoptosis
TNF $\alpha$	IL-8	VEGF	COX-2	MMP-1	c-Myc	IEX-1
IL-1	MCP-1	Angiop.	iNOS	MMP-3	Ciclina D	TRAF1
IL-2	ICAM-1			MMP-9		TRAF2
IL-6	VCAM-1			MMP-13		Bcl-2
IL-17	GM-CSF			Catepsinas		c-IAPs

**Tabla 1: Ejemplos de genes diana de NF- $\kappa$ B en función de su efecto en la articulación AR.** PGs, prostaglandinas; NO, óxido nítrico, TNF $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; IL, interleuquina; MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos-1; ICAM-1, molécula de adhesión intracelular-1; VCAM-1, molécula de adhesión celular vascular-1; GM-CSF, factor estimulador de colonias granulocito-macrófago; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; Angiop., angiopoyetinas; COX-2, ciclooxigenasa-2; iNOS, sintasa de óxido nítrico inducible; MMP, metaloproteasa; IEX-1, gen de respuesta inmediata temprana-1; TRAF, factor asociado a receptor de TNF; Bcl-2, linfoma de célula B-2; c-IAPs, inhibidores celulares de la apoptosis.

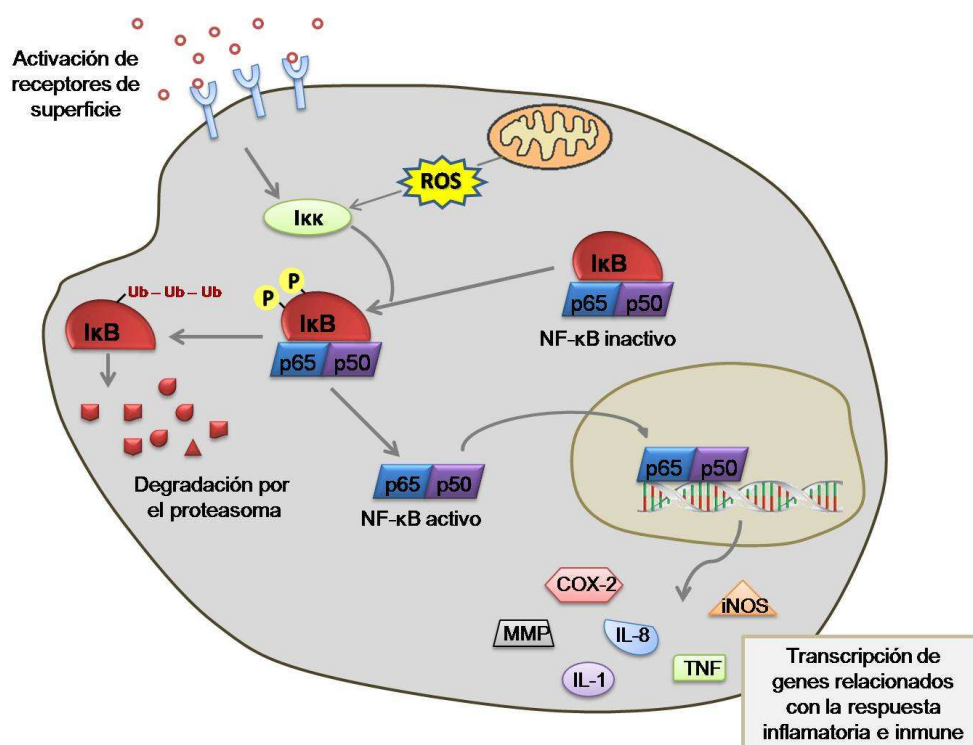
NF- $\kappa$ B es una familia de factores de transcripción diméricos que incluyen 5 miembros: c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50) y NF- $\kappa$ B2 (p52). Mayoritariamente, el dímero de NF- $\kappa$ B está formado por una subunidad p50 y una subunidad p65. En células no estimuladas, NF- $\kappa$ B se encuentra retenido en el citoplasma mediante su unión a sus proteínas inhibitorias I $\kappa$ B, por lo que la actividad transcripcional se ve inhibida. Existen varias rutas de activación y señalización de NF- $\kappa$ B (57, 58).

La activación de la “vía clásica” de NF- $\kappa$ B tiene lugar en respuesta a la estimulación de los receptores de IL-1 o TNF, de los TLR o los receptores de células T o B y conlleva la fosforilación, ubiquitinización y posterior degradación proteosomal de las proteínas I $\kappa$ B catalizada por las quinasas de I $\kappa$ B (IKKs). De esta manera, los dímeros de NF- $\kappa$ B (generalmente heterodímeros p50/p65) pueden traslocarse al núcleo donde se unen a su secuencia consenso en el ADN y llevan a cabo la transcripción génica. Esta ruta, la más común, es esencial en el desarrollo y función del sistema inmune, y cuando está alterada participa en la iniciación y progresión de enfermedades autoinmunes.

Existe una segunda vía de activación de NF- $\kappa$ B denominada “vía alternativa”, que se desencadena cuando se estimula, entre otros, el receptor de CD40, el receptor del factor activador de células B (BAFFR) o el receptor activador de NF- $\kappa$ B (RANK). El heterodímero de NF-

$\kappa$ B que se activa mediante esta ruta está generalmente compuesto por las subunidades RelB/p52. Esta ruta es especialmente importante en el desarrollo, selección y supervivencia de células B y T o en la diferenciación de células presentadoras de antígeno como las células dendríticas jugando por ello un papel destacado en la auto-reactividad del sistema inmune.

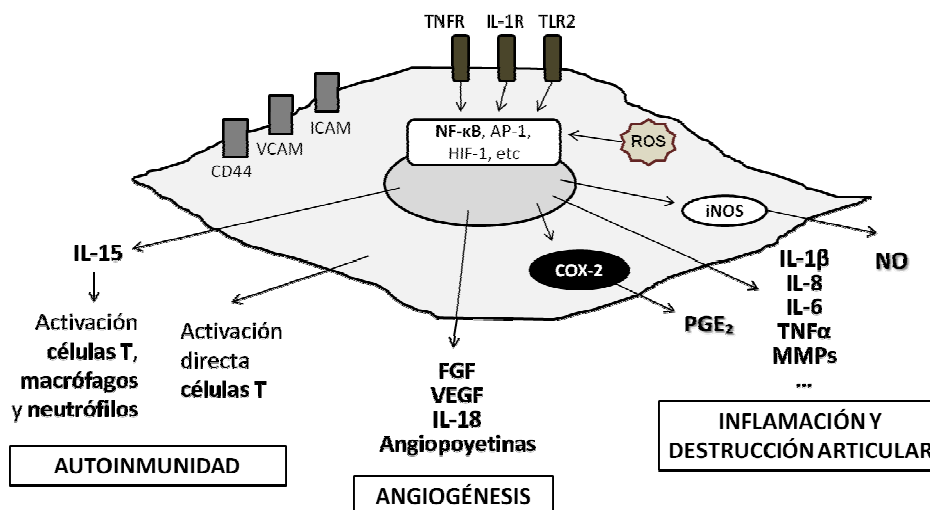
Se ha descrito, por último, una “vía atípica” de activación de NF- $\kappa$ B. Esta ruta respondería a estrés oxidativo así como a factores de estrés químicos y fisiológicos. Durante el envejecimiento, etapa en el que el estrés oxidativo es mayor en el organismo, se ha encontrado una mayor activación de NF- $\kappa$ B en diversos tejidos animales (58). Asimismo, se han encontrado elevados niveles de citoquinas proinflamatorias en estos tejidos. En fibroblastos de donantes más ancianos, se ha encontrado una respuesta inflamatoria crónica de baja intensidad y una activación constitutiva de NF- $\kappa$ B en comparación con donantes jóvenes (59).



**Figura 9: Esquema general de la activación de NF- $\kappa$ B.** En condiciones basales, NF- $\kappa$ B se encuentra secuestrado en el citoplasma por las proteínas I $\kappa$ B. Los estímulos activadores de NF- $\kappa$ B convergen en la fosforilación y activación de la quinasa de I $\kappa$ B (IKK). La IKK activada fosforila I $\kappa$ B, marcándola para su ubiquitinización y posterior degradación por el proteasoma. Así, el dímero de NF- $\kappa$ B (mayoritariamente el heterodímero p65/p50) es liberado e importado al núcleo, en donde se une al ADN para activar la transcripción de un gran número de genes involucrados en la inflamación y la respuesta inmune.

Las MAP quinasas (MAPK) son moléculas efectoras intracelulares involucradas en una cascada de señalización muy activa en sinoviocitos AR. Comprende 3 miembros: c-jun amino terminal quinasa (JNK), quinasa regulada por señal extracelular (ERK) y p38. La estimulación de las rutas MAPK por varias citoquinas, como IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$ , estrés oxidativo u otros tipos de estrés químico o físico resulta en la expresión de las proteínas Jun y Fos, que forman homodímeros y heterodímeros para formar el factor de transcripción AP-1. AP-1 es un factor de transcripción también sensible al estado redox cuya actividad está incrementada en sinovios AR y que conduce a la expresión de una variedad de citoquinas proinflamatorias, como el TNF $\alpha$  y MMPs (30, 38). Así, algunos de los efectos de la activación de AP-1 son el incremento en la proliferación celular, la inducción de osteoclastogénesis o la degradación de la matriz por los sinoviocitos (60, 61). De hecho, la actividad AP-1 ha sido directamente correlacionada con la severidad de la AR (37).

ROS puede inducir también la activación del factor inducible de hipoxia (HIF-1). Este factor se ha encontrado altamente activado en la sinovial AR, siendo responsable de la expresión, entre otros productos génicos, de VEGF (esencial en los procesos angiogénicos), y de MMPs (esenciales en los procesos angiogénicos y también de destrucción del cartílago) (62). Además, ha sido relacionado en distintos tipos celulares con la inducción de la expresión de COX-2 e IL-8 (63-65). Se trata de un factor dimérico formado por las subunidades HIF-1 $\beta$ , que se expresa constitutivamente y se mantiene a niveles constantes independientemente de los niveles de oxígeno; y la subunidad HIF-1 $\alpha$ , que aunque su síntesis es constitutiva, su estabilidad está altamente regulada por los niveles de oxígeno. Bajo condiciones de normoxia, HIF-1 $\alpha$  se degrada rápidamente. En hipoxia, sin embargo, se estabiliza y se trasloca al núcleo, en donde dimeriza con HIF-1 $\beta$  y el complejo formado se convierte en transcripcionalmente activo (66). La activación de HIF-1 es clave para la adaptación de las células a condiciones de hipoxia, activando la transcripción de genes relacionados con angiogénesis o con la ruta glucolítica para intentar restablecer el aporte de oxígeno y subsanar el defecto en la generación de ATP. Otros factores además de la hipoxia y ROS pueden inducir la activación de HIF-1, como las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , hormonas, factores de crecimiento o estrés mecánico, todos ellos factores importantes en la patología de la AR (67).



**Figura 10: Procesos de señalización celular en los que está implicado el sinoviocito AR.** Los sinoviocitos activados participan en una gran variedad de respuestas patológicas en la AR, como en autoinmunidad, angiogénesis, inflamación y destrucción articular. Responden a la estimulación por citoquinas y otras moléculas estimuladoras, a través de receptores de superficie como el receptor de TNF (TNFR), receptor de IL-1 (IL-1R) o receptores *Toll-like* (como TLR2). Estos receptores activan rutas de señalización que llevan a la activación de la transcripción de multitud de genes involucrados en la señalización de los sinoviocitos AR, principalmente a través de los factores de transcripción NF-κB, AP-1 o HIF-1. Estos factores de transcripción también pueden verse activados por el efecto de ROS. Además, el contacto directo de los sinoviocitos con células T puede activar a estas últimas. Los sinoviocitos presentan además moléculas de adhesión que regulan el tráfico de leucocitos en el tejido sinovial.

Nrf2 es un factor de transcripción, descrito en detalle en el apartado 3, que juega un papel protector en las enfermedades inflamatorias como la AR (27). Se encuentra activado en la sinovial de pacientes AR y también se han encontrado niveles aumentados de su enzima diana HO-1 en el líquido sinovial AR (68, 69). Así, aunque este factor antioxidante no logra controlar el estrés oxidativo asociado a la patología, su silenciamiento provocaría un agravamiento de los síntomas y de la destrucción articular (68, 70). Por el contrario, su inducción con el agente gastroprotector rebamipide atenúa la severidad de la artritis en ratones inhibiendo la inflamación articular (71). Además, el inductor de Nrf2 sulforafano también ha demostrado la capacidad de inducir apoptosis en sinoviocitos inflamados (estimulados con TNFα) pero no en sinoviocitos sanos (72). De hecho, se cree que las sales de oro utilizadas en el tratamiento de la AR basan su efectividad en la activación del sistema Nrf2 (73).

En conclusión, el sinoviocito AR está implicado en el reclutamiento, retención y activación de células inflamatorias, angiogénesis, y destrucción del hueso y del cartílago (74).

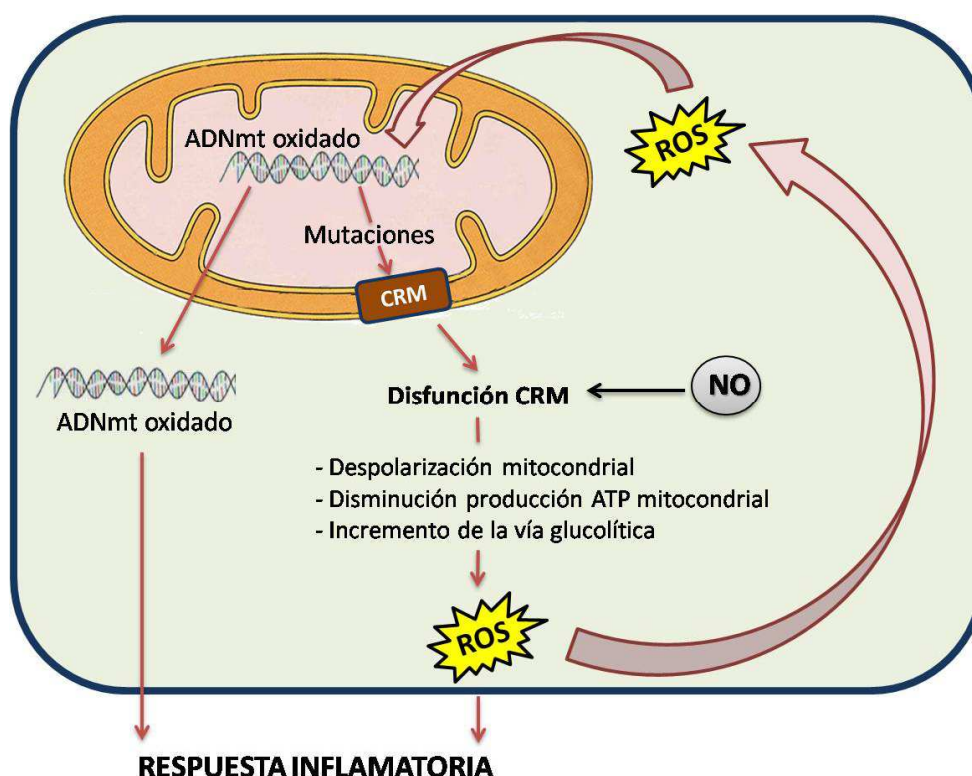
#### 4.5. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ESTRÉS OXIDATIVO EN AR

En los últimos años han surgido numerosas evidencias de que la disfunción mitocondrial puede jugar un papel crucial en la patología de las artritis inflamatorias. Así, se ha demostrado que el ADNmt de pacientes con AR presenta una mayor tasa de mutaciones somáticas así como un mayor grado de oxidación (75, 76). Debido a que el ADNmt codifica para 13 polipéptidos que forman parte de complejos de la cadena de transporte electrónico, una elevada tasa de mutación puede provocar una síntesis defectuosa de los complejos de la CRM, con la consiguiente disfunción mitocondrial. De acuerdo con esta teoría, en la sinovial AR hipóxica se ha descubierto una deficiencia en la actividad del complejo IV de la CRM (77). Además, también se han descrito hallazgos similares en artritis idiopática juvenil, en donde se ha encontrado una expresión disminuida de genes codificados por ADNmt, entre ellos los genes que codifican para 2 subunidades del complejo IV de la CRM (78). Otro estudio demuestra que los linfocitos periféricos de pacientes AR presentan mitocondrias despolarizadas y un mayor estrés oxidativo (79). Además, se sabe que el NO, que es un mediador producido en grandes cantidades en la sinovial AR, altera la función mitocondrial de los sinoviocitos, despolarizando la membrana y provocando una disminución en la producción de ATP (80). En AR se ha encontrado una correlación entre la actividad de la enfermedad y la presencia de estrés oxidativo (81), especialmente daño oxidativo en el ADN (82). Estudios previos encontraron un aumento en los niveles de marcadores de estrés oxidativo y una disminución en los niveles de antioxidantes en el suero y líquido y tejido sinovial de pacientes AR, además de daño oxidativo en el cartílago (75, 81-86).

De hecho, los tratamientos anti-TNF que resultan eficaces en artritis inflamatorias provocan una disminución en los niveles de estrés oxidativo y en la mutagénesis mitocondrial inducida por hipoxia, lo que sugiere la relación del estrés oxidativo con la enfermedad (87). También el tratamiento combinado del antioxidante coenzima Q<sub>10</sub> con el habitual tratamiento de la AR con metotrexato, proporciona un efecto protector en un modelo de artritis inducida por antígeno al disminuir la oxidación de proteínas y lípidos (88). Estos datos confirman la importancia del estrés oxidativo en la patogénesis de la AR.



Por otra parte, parece que este daño mitocondrial se correlaciona con el estado inflamatorio de los tejidos (89). En este sentido, se ha encontrado ADNmt oxidado en el líquido sinovial de pacientes AR pero no en pacientes sanos (75). Como se ha mencionado con anterioridad, esta molécula es considerada un DAMP, una señal de peligro capaz de desencadenar una respuesta inmune. De hecho, se ha demostrado que el ADNmt oxidado es capaz de inducir artritis en articulaciones murinas (90). El conjunto de evidencias que señalan a una disfunción mitocondrial como un factor involucrado en la patología AR se resume en la Figura 11.



**Figura 11: Evidencias de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en sinoviocitos AR.** Durante la última década, y cada vez con mayor frecuencia, los estudios apuntan a un estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en los sinoviocitos, e incluso en células circulatorias, de pacientes AR, correlacionándose con la actividad de la enfermedad. Además, los niveles de antioxidantes se encuentran disminuidos respecto a pacientes sanos, lo que agrava el desequilibrio redox. La producción de ROS es la responsable de la oxidación del ADNmt (además de otras moléculas en la célula), que, con gran probabilidad, provoca un incremento significativo en la tasa de mutación del ADNmt encontrada en estos pacientes respecto a pacientes sanos. Estas mutaciones, así como la elevada producción de NO, serían las responsables de una pérdida de la función mitocondrial (disminución de la actividad de los complejos, despolarización, y disminución de la producción de ATP), que provocaría la liberación de más ROS, agravando el estado redox celular. Por otra parte, el ADNmt oxidado es capaz, por sí solo, de inducir una respuesta inflamatoria.

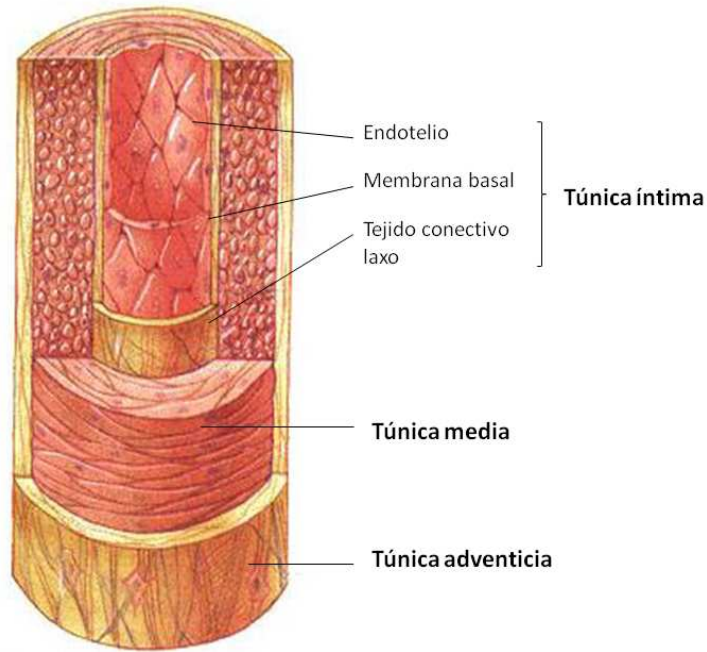
Una característica de la sinovial AR que agrava el estrés oxidativo en el tejido es la situación de hipoxia. El tejido sinovial, que en condiciones normales está vascularizado proporcionando un adecuado aporte de oxígeno, incrementa drásticamente su vascularización en AR, creando más vasos sanguíneos que intentan aportar el oxígeno necesario a la nueva masa celular. Sin embargo, este proceso de angiogénesis no es suficiente (o es defectuoso) para abastecer de oxígeno a toda la nueva masa celular en el tejido, que crece descontroladamente. Por ello, la sinovial AR es hipóxica, presentando una presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ) < 5%. Aunque se puede interpretar que al existir menos oxígeno disponible, la producción de ROS será menor, la realidad es que se ha demostrado que durante la hipoxia se incrementa la liberación de ROS, produciéndose además una mayor tasa de mutaciones en el ADNmt en sinoviocitos humanos (77, 91). Además, el proceso de angiogénesis permite la infiltración de células inmunes activadas, como los macrófagos, lo que supone una enorme carga oxidativa al tejido sinovial, ya que son responsables del “estallido oxidativo” propio de su función protectora frente a patógenos. Asimismo, el tejido sinovial sufre continuamente procesos de severa hipoxia y re-oxigenación. Es sabido que la re-oxigenación de los tejidos inmediatamente después de un episodio de hipoxia provoca serios daños oxidativos al tejido afectado (procesos de isquemia/reperfusión). En la sinovial AR, este proceso resulta de gran importancia, incrementando, por tanto, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (92).

## 5. El envejecimiento en el sistema vascular

### 5.1. EL SISTEMA VASCULAR

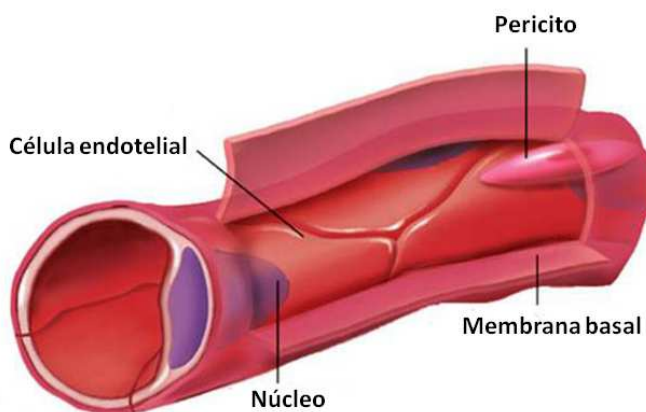
El sistema cardiovascular aporta oxígeno, nutrientes y otras moléculas esenciales a los tejidos, mientras recoge y transporta los productos de desecho hacia los órganos encargados de su eliminación. Estos productos se diluyen en la sangre, que los transporta a través de los vasos sanguíneos.

La estructura de la pared de un vaso sanguíneo (Figura 12) varía en función del tipo de vaso. Las arterias y venas consisten en 3 capas adyacentes: la túnica íntima (más interna), la media y la adventicia (más externa). La túnica íntima está formada por una única capa de células endoteliales, directamente en contacto con el lumen del conducto, embebidas en una matriz extracelular, y apoyadas en una membrana basal. Bajo ésta se encuentra una capa de tejido conectivo laxo. La túnica media la comprenden células musculares lisas, la lámina elástica, fibras de colágeno y fibrillas elásticas, todo ello embebido en una matriz extracelular. Por último, la túnica adventicia es la más variable, conteniendo nervios, tejido fibroelástico denso y vasos que le aportan nutrientes. Su principal componente es el colágeno, que sirve para anclar el vaso a los órganos adyacentes, proporcionándole estabilidad (93).



**Figura 12: Estructura general de un vaso sanguíneo.** En la imagen se observan las tres capas o túnica de las que se compone un vaso sanguíneo. La túnica íntima, en contacto con el lumen del vaso, presenta en su capa más interna el endotelio, la capa de células endoteliales en contacto con el torrente sanguíneo. Estas células se mantienen sobre una membrana basal, que, a su vez, descansa en una capa de tejido conectivo laxo. La túnica media está esencialmente formada por células musculares lisas, ejecutoras de los procesos de vasodilatación y vasoconstricción, y embebidas en una matriz extracelular rica en fibras elásticas y de colágeno. En la parte más externa del vaso, se encuentra la túnica adventicia, rica en colágeno, que se encarga del anclaje y la estabilidad del vaso en el tejido. *Adaptado de Hole's human and physiology, 7th edition, by Shier, et al. copyright 1996 TM Higher Education Group, Inc.*

Los capilares son los vasos más pequeños (Figura 13). Consisten tan sólo en una capa de células endoteliales que se rodea de pericitos. Los pericitos son células de tipo músculo liso que proporcionan al vaso diversas funciones (contráctil, de soporte, participación en la angiogénesis, etc).



**Figura 13: Estructura de un capilar sanguíneo.** Los capilares consisten tan sólo en una capa de células endoteliales que se distribuyen en estructuras tridimensionales que presentan un conducto por el que el flujo sanguíneo llega, en última instancia, a los tejidos. Adheridos por la cara externa a las células endoteliales, se encuentran unas células llamadas pericitos que ejercen funciones de soporte, entre otras. Pericitos y células endoteliales descansan sobre una membrana basal que recubre el capilar.

*Modificado de <http://www.baileybio.com/plogger/?level=album&id=36>.*

El endotelio es el responsable de la capacidad de los vasos sanguíneos para alterar su estructura en respuesta a cambios hemodinámicos. En condiciones normales el endotelio mantiene el tono vascular relajado gracias a su activa función secretora e impide el crecimiento del músculo liso, la adhesión y agregación de plaquetas y leucocitos y la trombosis. Por ello, una disfunción endotelial provoca una respuesta vasoconstrictora con elevación de la presión arterial, estimulación del crecimiento del músculo liso vascular y un aumento de la adhesión y agregación plaquetaria con efectos trombogénicos.

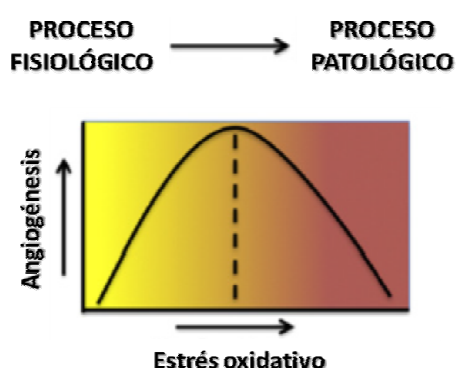
Con el envejecimiento, se produce una disfunción endotelial que conduce a un incremento de la incidencia de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, que en la actualidad han llegado a constituir la primera causa de muerte en el mundo, según la Organización Mundial de la Salud. La mortalidad en Galicia por enfermedades de corazón se sitúa en un 36%.

## 5.2. LA TEORÍA DEL ENVEJECIMIENTO EN EL SISTEMA VASCULAR

Se han encontrado numerosas evidencias de que la producción de ROS en el sistema vascular aumenta significativamente durante el envejecimiento, tanto en las células endoteliales como en las células de músculo liso (94, 95). Además, el estrés oxidativo mitocondrial juega un papel importante en la disfunción vascular relacionada con el envejecimiento, que es potenciada por una actividad incrementada de las oxidasas citoplasmáticas o de la membrana plasmática (96, 97). El estrés oxidativo puede jugar un papel central en el crecimiento de vasos sanguíneos a múltiples niveles, interviniendo por tanto en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis o la hipertensión. En primer lugar, el desequilibrio redox puede llevar a la senescencia celular, reduciendo la capacidad proliferativa de las células endoteliales y alterando su función (98). Asimismo, en las células endoteliales, el estrés oxidativo afecta a la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y a la biodisponibilidad del NO, que en condiciones fisiológicas realiza una esencial función vasodilatadora (98). Así, el aumento de  $O_2^-$  en el endotelio durante el envejecimiento afecta a la vasodilatación, lo que predispone o causa hipertensión, y a la formación de vasos colaterales, lo que impide una correcta re-vascularización de una zona dañada. Además, el  $O_2^-$  reacciona rápidamente con el NO, y como resultado de esta reacción se forma peroxinitrito, una de las ROS más tóxicas que puede oxidar lípidos, dañar las membranas lipídicas, eliminar grupos tioles y alterar la función de diversas enzimas. Por último, las ROS participan también en la acción hipertrófica de la angiotensina II sobre el músculo liso vascular y contribuyen a la inflamación vascular estimulando la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (93).

En las células endoteliales, las ROS se generan mayoritariamente por las NADPH oxidasas. Las ROS producidas por estas enzimas modulan la señalización celular y se ha encontrado que son necesarias para la angiogénesis ya que regulan la producción de factores de crecimiento angiogénicos como el VEGF (99-101). Así, en determinadas condiciones, ROS puede provocar una hiperestimulación de las células endoteliales mediante la inducción de la producción de VEGF y la amplificación de sus efectos intracelulares al incrementar también la expresión de sus dianas (102). Sin embargo, se conoce que una producción excesiva de ROS inhibe la proliferación endotelial. La explicación más aceptada ante esta aparente contradicción en cuanto a la regulación de la angiogénesis mediada por ROS guarda relación con el grado de

estrés oxidativo al que las células endoteliales estén sometidas. Aunque no es un fenómeno universal, numerosos estudios indican que un bajo grado de estrés oxidativo es responsable de las respuestas fisiológicas de crecimiento vascular y que éste aumenta a medida que aumenta la producción de ROS. Llegado a cierto umbral, un alto grado de estrés oxidativo o una prolongada exposición a él, contribuye al crecimiento vascular y remodelación patológicos, cuyas dimensiones disminuyen a medida que aumenta la cantidad de ROS, como se representa en la Figura 14 (101).



**Figura 14: Modulación del proceso angiogénico dependiente del grado de estrés oxidativo en condiciones fisiológicas y patológicas.** Las ROS pueden modular el grado de crecimiento y remodelación vascular. En condiciones fisiológicas, el proceso de angiogénesis es estimulado por un estrés oxidativo de bajo grado. Sin embargo, en condiciones patológicas, la tasa de formación de nuevos vasos sanguíneos decae de manera gradual cuando los niveles de estrés oxidativo en el tejido son muy elevados.

### 5.3. DISFUNCIÓN DE NRF2 ASOCIADA A LA EDAD EN EL SISTEMA VASCULAR

Existen cada vez más evidencias de que el envejecimiento viene asociado con una disfunción de Nrf2 en la vasculatura, de manera que la activación de Nrf2 y la transcripción de sus genes relacionados no se llevan a cabo eficazmente (103-105). La menor actividad transcripcional probablemente se debe a que los niveles de expresión de Nrf2 están disminuidos en la vasculatura tanto a nivel proteico como a nivel génico (104).

En cualquier caso, esta disfunción de Nrf2 conduce a una exacerbación del estrés oxidativo celular asociado al envejecimiento y a aumentar la sensibilidad del sistema vascular envejecido al daño celular inducido por el estrés oxidativo, incluyendo una menor resistencia a la apoptosis (104).

Este incremento en el estrés oxidativo causado por la desregulación de Nrf2 en la vasculatura resulta en disfunción endotelial, aumenta la susceptibilidad de los vasos al daño en enfermedades metabólicas y promueve el desarrollo de enfermedades vasculares ateroscleróticas (incluyendo infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o demencia vascular) (105, 106).

Se cree que el estrés oxidativo asociado al envejecimiento lleva a una inflamación vascular crónica de baja intensidad que promovería el desarrollo de la enfermedad de la arteria coronaria o el infarto en edades avanzadas (107). Además, se ha encontrado una correlación entre el aumento de estrés oxidativo asociado a la edad con una elevada tasa de apoptosis de las células endoteliales, lo que lleva a la rarefacción microvascular, es decir, la pérdida progresiva de capilares por apoptosis y falta de formación de nuevos vasos.

La rarefacción microvascular conlleva defectos de irrigación y se considera un factor patogénico en enfermedades como la hipertensión arterial, o la pérdida neuronal asociada al envejecimiento (108, 109). De hecho, tratamientos anti-hipertensivos se asocian con una prevención de la rarefacción microvascular (110). Se han encontrado numerosas evidencias de rarefacción vascular asociada al envejecimiento en el músculo cardíaco, músculo esquelético y también en zonas del córtex cerebral.

#### **5.4. EL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS Y SU DISFUNCIÓN EN EL ENVEJECIMIENTO**

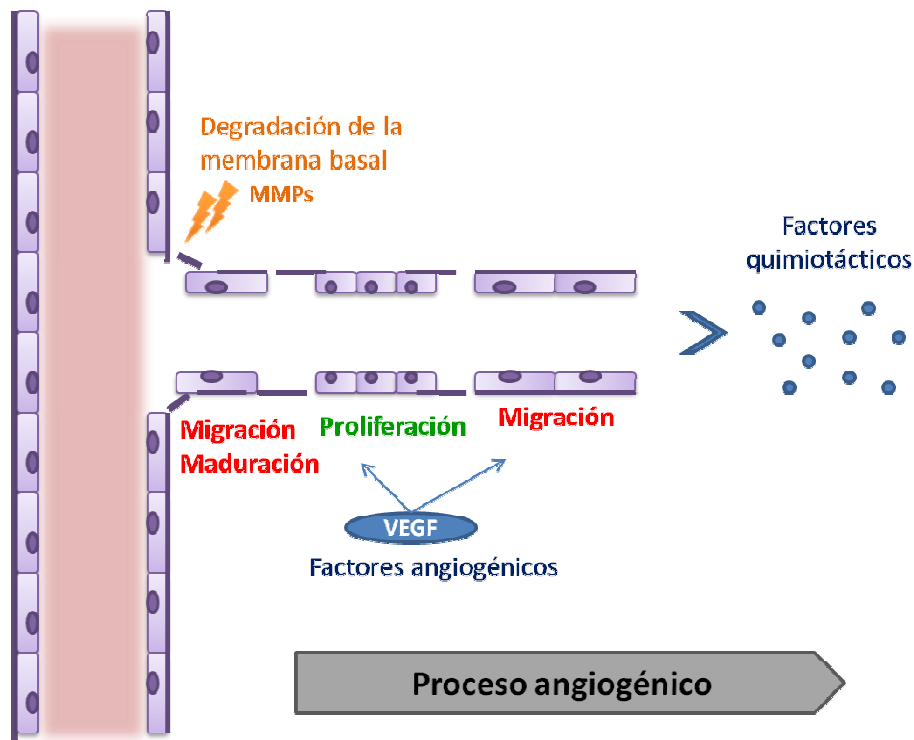
La angiogénesis es un proceso fundamental por el que se producen nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos ya existentes. Aunque conllevan también la creación de nuevos vasos sanguíneos, es importante diferenciar la vasculogénesis, que se refiere al proceso de creación de estructuras vasculares de novo a partir de células progenitoras, de la angiogénesis, en la que las nuevas estructuras vasculares se forman a partir de vasos ya existentes mediante migración y proliferación de células endoteliales ya diferenciadas. Por otra parte, se diferencia de la arteriogénesis en que ésta supone la formación y crecimiento de grandes vasos sanguíneos mientras que la angiogénesis implica la formación de vasos de pequeño calibre (capilares).

La angiogénesis tiene lugar tanto en condiciones fisiológicas (como en el sistema reproductor femenino, en respuesta al ejercicio o en la cicatrización de heridas) como en condiciones patológicas (como el crecimiento tumoral o la artritis).



#### 5.4.1. El proceso de angiogénesis

El proceso de angiogénesis se encuentra estrechamente regulado por distintas moléculas con propiedades proangiogénicas como VEGF, bFGF, angiotensina o citoquinas como la IL-1 o el TNF $\alpha$ ; y moléculas antiangiogénicas como la angiostatina, la endostatina o TIMPs (inhibidores tisulares de MMPs), en función de las necesidades fisiológicas que primen en un momento y tejido determinado. Cuando el balance entre estas moléculas favorece la angiogénesis, las células endoteliales son “activadas” y tiene lugar un proceso por etapas que dará lugar al nuevo vaso sanguíneo (Figura 15). En primer lugar, las células endoteliales liberan proteasas para la degradación de la membrana basal del vaso progenitor. A continuación se produce la migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico y su proliferación, a medida que las células que migran en el borde del nuevo capilar van avanzando. En esta etapa, los mediadores angiogénicos, especialmente VEGF, juegan un papel esencial. A medida que las células endoteliales maduran, se disponen en forma de tubos capilares dejando el espacio que forma el lumen del vaso; se produce el reclutamiento de los pericitos y la formación de la nueva membrana basal; y se producen procesos de adhesión tanto célula-célula como célula-membrana basal, en los que participan moléculas de adhesión. Por último, se inicia el flujo sanguíneo a través del nuevo vaso.



**Figura 15: El proceso de angiogénesis.** La angiogénesis se inicia por la degradación de la membrana basal predominantemente mediante la acción de MMPs. A continuación, factores angiogénicos inducen la migración y proliferación de las células endoteliales en dirección a los estímulos que inducen el proceso. A medida que las células endoteliales más distales avanzan hacia el foco quimioatractivo, las células endoteliales más proximales al vaso progenitor comienzan a madurar y estabilizarse, formando la membrana basal e incorporando pericitos a su alrededor.

#### 5.4.2. Reguladores del proceso angiogénico durante el envejecimiento

La homeostasis del sistema vascular, para mantener un adecuado aporte sanguíneo a los tejidos, está regulada por múltiples mecanismos. Estímulos como la hipoxia o una elevada demanda metabólica debida al ejercicio inducen la angiogénesis a través de múltiples vías, comúnmente mediante la secreción de mediadores angiogénicos como VEGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el FGF, angiopoyetinas, o factores endocrinos como el IGF-1 (*insulin-like growth factor-1* o factor de crecimiento insulínico); o los estrógenos, que realizan múltiples funciones en relación con la angiogénesis, incluida la estimulación de la producción de NO o la protección endotelial frente a la senescencia (lo que explica el incremento del riesgo cardiovascular de las mujeres tras la menopausia). La expresión de eNOS sufre una disminución

durante el envejecimiento, lo que también repercute en la función endotelial (111). En el caso de la angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2, sus niveles se mantienen durante el envejecimiento, sin embargo disminuye la expresión de su receptor Tie-2 (112). A continuación, se describe con mayor detalle la función e importancia de dos de los factores mencionados, por estar directamente implicados en este trabajo: VEGF e IGF-1.

La producción de VEGF, uno de los factores angiogénicos más importantes, así como la expresión de sus receptores, se encuentra disminuida en el envejecimiento (112-114). Una de las vías mejor conocidas de producción de VEGF es la de HIF-1, un factor de transcripción que, como se ha descrito anteriormente, se activa en respuesta a condiciones de hipoxia y que se encarga de su transcripción. Durante el envejecimiento, sin embargo, la actividad de HIF-1 se ve significativamente reducida, y esto parece ser la principal razón por la que la producción de VEGF se ve disminuida en animales durante el envejecimiento (115). Se ha demostrado que el ejercicio físico moderado puede ser beneficioso en el envejecimiento, al restablecer la actividad de HIF-1 y la neovascularización inducida por isquemia en animales viejos. Se postula que, en animales sedentarios, la disminución de HIF-1 podría explicarse debido a un aumento de glucocorticoides endógenos, que pueden inhibir la transcripción de HIF-1 $\alpha$ , o a una disminución de los niveles de importina-1 $\alpha$ , que dificultaría el transporte de HIF-1 $\alpha$  al núcleo (116, 117).

Debido a la gran importancia de VEGF en el proceso angiogénico tras un evento de isquemia, y su baja disponibilidad durante el envejecimiento, se han realizado ensayos clínicos administrando este factor de crecimiento en pacientes con enfermedad isquémica severa del corazón para provocar la angiogénesis. Aunque los ensayos preclínicos muestran resultados esperanzadores, los resultados en humanos hasta el momento no han sido completamente satisfactorios (118-120).

Por otra parte, el IGF-1 también ejerce efectos protectores en el sistema vascular, además de otras múltiples funciones en el organismo. La producción endocrina de IGF-1 se lleva a cabo en el hígado a partir de la estimulación con la hormona de crecimiento. La hormona de crecimiento se sintetiza en la glándula pituitaria, y se libera al torrente sanguíneo, a través del cual llega al hígado para estimular la producción de IGF-1. También existe una producción local de IGF-1, con efectos paracrinos y autocrinos.

Tanto los niveles de IGF-1 circulantes como los producidos localmente contribuyen al mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la microcirculación incrementando la biodisponibilidad de NO, disminuyendo la producción de ROS y ejerciendo efectos antiinflamatorios, antiapoptóticos y proangiogénicos (121). Se ha demostrado que los niveles circulantes y locales de IGF-1 disminuyen con la edad, y se hipotetiza que esta disminución es una causa de las alteraciones fenotípicas del sistema vascular relacionadas con el envejecimiento.

#### **5.4.3. Disfunción en el proceso de angiogénesis**

El envejecimiento afecta negativamente a la capacidad angiogénica de las células endoteliales. Se ha observado en ratones, así como en pacientes, que no sólo existe una menor cantidad de VEGF o IGF-1 circulante en el envejecimiento, si no que la respuesta de las células endoteliales a la estimulación con factores angiogénicos se ve drásticamente reducida con la edad avanzada (122-126).

El proceso de angiogénesis es de gran importancia para la favorable evolución de los pacientes con problemas vasculares como el daño isquémico o la rarefacción vascular. Debido a que el envejecimiento es un factor de riesgo para estos eventos, la disfunción de la capacidad angiogénica en el envejecimiento agrava las consecuencias de dichas enfermedades y contribuye a un peor pronóstico en pacientes ancianos, afectando a los procesos de reparación cardíaca y a la adaptación a cambios en la demanda y aporte de oxígeno del tejido (por ejemplo en respuesta al ejercicio o a un evento de isquemia consecuencia del estrechamiento aterosclerótico de las arterias coronarias) (127).

El envejecimiento deteriora el proceso angiogénico de múltiples maneras: afecta negativamente a la densidad de capilares así como a la vasodilatación y la función de la eNOS; se produce un aumento en la expresión de TIMPs, por lo que se inhibe la actividad de MMPs necesaria para la degradación de la matriz y la membrana basal en el inicio de la angiogénesis; reduce la capacidad de respuesta de las células endoteliales a factores angiogénicos; también afecta a la producción de factores de crecimiento y a la activación de HIF-1 $\alpha$ , que se ven disminuidas (128). La paradójica disminución de la actividad de HIF-1 en el envejecimiento (se esperaría que el estrés oxidativo asociado al envejecimiento indujera su activación) es,

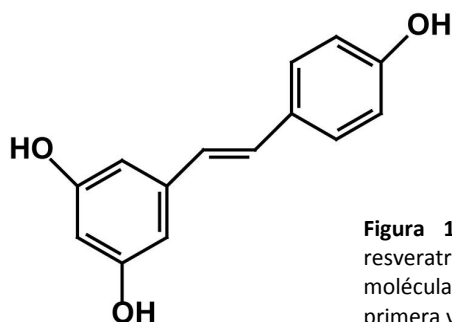
probablemente, debida a un defecto en la importina-1 $\alpha$ , la proteína encargada de su transporte al núcleo (117).

Así, las células endoteliales senescentes presentan una menor capacidad proliferativa, una menor producción de factores de crecimiento y una reducida capacidad de migración, lo que a su vez impide una correcta formación de tubos. Además, la funcionalidad de las células endoteliales senescentes se ve comprometida, lo que contribuye a la formación de la placa aterosclerótica (98).

## 6. Estrategias antioxidantes: el resveratrol

A la vista del relevante papel que juega el estrés oxidativo en diversas enfermedades, los antioxidantes naturales se han alzado como una potencial estrategia para mejorar los síntomas de la AR y de otras enfermedades inflamatorias asociadas al estrés oxidativo. Las búsquedas bibliográficas de antioxidantes provenientes de productos naturales, como el resveratrol o la curcumina, revelan el gran interés de la comunidad científica en estos compuestos. Así, durante los últimos 10 años, la base de datos PubMed registró un incremento exponencial de las publicaciones relacionadas con estas moléculas.

El resveratrol (RSV) es un polifenol natural derivado mayoritariamente de las uvas tintas, y sus derivados como el vino tinto, y también de otros frutos rojos como arándanos, grosellas o granadas, así como en cacahuetes o brécol. Esta molécula ha demostrado poseer propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en numerosos tipos celulares.



**Figura 16: Estructura química del resveratrol.** El resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxistilbeno) es una molécula aromática derivada del estilbeno, aislada por primera vez en 1940 e identificada como una fitoalexina.

Posiblemente, el primer uso conocido en la salud humana del extracto de uva data de hace aproximadamente unos 2000 años. Se trata de una preparación herbal ayurvédica originaria de la India, cuyo principal ingrediente era *Vitis vinífera* L y entre cuyos componentes se encuentra el RSV. Esta preparación, “Darakchasava”, era prescrita entre otras cosas, como cardiotónico o antipirético, y para tratar diversas enfermedades como tumores, anemia o tuberculosis (129).

En general, aunque los estudios clínicos en humanos son limitados, se ha encontrado una gran cantidad de evidencias de sus efectos beneficiosos en estudios *in vitro* y en animales.

Estas propiedades beneficiosas incluyen propiedades anticancerígenas (suprime la proliferación de una gran variedad de células tumorales), neuroprotectoras, cardioprotectoras, antioxidantes, antiangiogénicas y antiinflamatorias (130-132).

En particular, RSV ha demostrado la capacidad de inhibir la respuesta oxidativa y la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la síntesis de múltiples mediadores proinflamatorios (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, MMP-9, VEGF, COX-2...), la modulación de la síntesis de prostaglandinas, la inhibición de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP-1, HIF-1 o la inhibición de la enzima iNOS (133). En cuanto a su posible utilización en las artritis inflamatorias, modelos animales demuestran que un tratamiento con RSV, en dieta o inyección intraarticular, puede proteger a la articulación frente al desarrollo de la enfermedad (134-136). Además, un estudio reciente en sinoviocitos procedentes de pacientes AR muestra que el RSV es capaz de modular la expresión de genes involucrados en la proliferación y la apoptosis, dos procesos altamente alterados en AR, ejerciendo efectos antiproliferativos y proapoptóticos en esas células (137). El RSV también ha mostrado efectos interesantes respecto a la protección de la función mitocondrial. Es capaz, por ejemplo, de reducir la formación de radicales libres, así como de impedir la despolarización de la membrana mitocondrial y la depleción de ATP; o inducir autofagia, biogénesis mitocondrial y proteger de la apoptosis (138-141). Sin embargo, existen diversos estudios que muestran resultados contradictorios respecto al efecto *in vitro* o *in vivo* del RSV, por lo que todavía es necesario estudiar en mayor profundidad el mecanismo de acción y los efectos de este polifenol (25, 142, 143).

Actualmente, se cree que el RSV puede actuar directamente sobre la enzima fosfodiesterasa, que es responsable de la degradación del AMP cíclico (AMPc), e inhibirla (144). Así, el RSV induce un incremento de los niveles AMPc, que provocarían un aumento de expresión de la enzima AMP quinasa (AMPK). A su vez, se ha demostrado que la AMPK es capaz de inhibir la señalización de NF- $\kappa$ B y, por tanto, la inflamación (145). AMPK también activa directamente la vía de autofagia/mitofagia y puede activar PGC-1 $\alpha$  (*(PPAR) gamma coactivator 1*), que induce biogénesis mitocondrial y activa una respuesta antioxidante mediada por sirtuína3 (146). La estimulación simultánea de mitofagia y biogénesis mitocondrial proporcionaría un mecanismo contra la proliferación de mitocondrias disfuncionales, un hecho que resulta prometedor en relación a enfermedades asociadas a disfunción mitocondrial.





## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



Como se ha descrito anteriormente, el incremento en la producción de ROS o la disfunción de los sistemas antioxidantes en los tejidos pueden ejercer un papel clave en el desarrollo de diversas patologías humanas.

Así, en AR se ha descrito un aumento del estrés oxidativo acompañado de disfunción mitocondrial, especialmente en el tejido sinovial. Una de las principales características de esta enfermedad es el alto grado de inflamación presente en las articulaciones afectadas. Aunque el estrés oxidativo está ampliamente relacionado con el proceso inflamatorio, nunca ha sido estudiada la relación entre la disfunción mitocondrial del sinoviocito humano y la inflamación. Por ello, en este trabajo se ha evaluado la hipótesis de que la disfunción mitocondrial asociada a la patología artrítica puede inducir la respuesta inflamatoria en los sinoviocitos y hacer más sensibles a estas células al efecto inflamatorio inducido por la citoquina IL-1 $\beta$ .

Las enfermedades vasculares asociadas al envejecimiento constituyen otro ejemplo de patologías relacionadas con el estrés oxidativo. Durante el envejecimiento, el proceso angiogénico sufre un deterioro, reduciéndose su respuesta a la estimulación angiogénica. Ello puede constituir un factor causal o agravante de enfermedades como la demencia senil o impedir la recuperación de las zonas afectadas en un proceso isquémico. Se ha relacionado, además, el envejecimiento con una disfunción en el sistema antioxidante Nrf2/ARE. Sin embargo, no está clara la relación entre la disfunción del sistema Nrf2 asociada al envejecimiento con la capacidad angiogénica de las células endoteliales. En este estudio se ha planteado la hipótesis de que la inhibición de la señalización de Nrf2 afecta negativamente a la capacidad angiogénica de las células endoteliales procedentes de arteria coronaria, simulando así el fenotipo vascular del envejecimiento.

En base a estos precedentes e incógnitas, se han planteado los siguientes objetivos:

**A. Estudiar el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria del sinoviocito humano normal en cultivo.**

1. Valorar la capacidad de oligomicina para inducir disfunción mitocondrial en sinoviocitos humanos normales en cultivo.

2. Determinar el efecto de la disfunción mitocondrial en la expresión de los mediadores inflamatorios COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8 en sinoviocitos humanos normales en cultivo.
3. Determinar la expresión de los mediadores inflamatorios COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8 en sinoviocitos humanos con disfunción mitocondrial expuestos a IL-1 $\beta$ .
4. Estudiar posibles vías de señalización involucradas en la respuesta inflamatoria inducida por disfunción mitocondrial: estudio del papel de ROS, NF- $\kappa$ B, AP-1, Nrf2 y caspasas.
5. Confirmar si otros inhibidores mitocondriales reproducen los efectos de oligomicina.
6. Investigar el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la capacidad de los sinoviocitos para inducir angiogénesis: estudio de la activación de HIF-1, la expresión de VEGF y la inducción de formación de tubos en células endoteliales.
7. Determinar el posible efecto protector del RSV frente a las consecuencias inflamatorias y/o angiogénicas de la disfunción mitocondrial en sinoviocitos humanos.

**B. Estudiar el papel de Nrf2 en la capacidad angiogénica de células endoteliales de arteria coronaria humana en cultivo.**

8. Determinar el efecto de los factores proangiogénicos VEGF e IGF-1 sobre la activación de Nrf2.
9. Determinar si una disfunción en la ruta de señalización de Nrf2 (mediante silenciamiento génico o sobreexpresión de Keap1) en células endoteliales de arteria coronaria afecta a los procesos angiogénicos de proliferación, adhesión, migración y capacidad de formación de estructuras tubulares similares a capilares.
10. Estudiar el efecto de la disfunción de Nrf2 en la sensibilidad apoptótica de las células endoteliales de la arteria coronaria humana.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **A. Estudio del efecto de la disfunción mitocondrial en el proceso inflamatorio del sinoviocito humano normal en cultivo**

### **1. CULTIVO CELULAR**

#### **1.1. Obtención de muestras de tejido sinovial**

El tejido sinovial humano se obtuvo de la articulación de la rodilla procedente de amputaciones de 31 donantes adultos sin historia de enfermedad articular. La media de edad de los donantes fue de  $64 \pm 14$  años. La sinovial se troceó y se digirió con dispasa (Gibco BRL, Paisley, UK) a  $37^\circ\text{C}$  durante 60 min. El digerido se centrifugó y las células obtenidas fueron resuspendidas y sembradas en medio de cultivo RPMI (Lonza, Basel, Suiza) suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF), 100 U/ml de penicilina / 100  $\mu\text{g/ml}$  estreptomicina (Gibco) y 0.12 UI/ml de insulina humana (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca).

Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, cumpliendo con los requisitos éticos de la Declaración de Helsinki y contaron con la aprobación del Comité Ético de Investigación de Galicia. Se ha obtenido el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes donantes de muestras sinoviales, y todas las muestras se codificaron para ser tratadas de manera anónima.

#### **1.2. Cultivo primario de sinoviocitos**

Inmediatamente tras la digestión enzimática, la suspensión celular está formada por un grupo heterogéneo de células, principalmente eritrocitos y sinoviocitos tipo A (macrófagos) y tipo B (sinoviocitos fibroblásticos). Las células crecieron en una monocapa en frascos de cultivo de  $162\text{ cm}^2$  cambiando el medio cada 2 días y se expandieron mediante sucesivas tripsinizaciones.

Tras el segundo pase de tripsinización, se obtiene una población homogénea de células adherentes, presentando tan sólo el fenotipo de tipo fibroblasto con la típica morfología fusiforme. Para la caracterización celular se realizó una citometría de los marcadores de superficie CD90 (marcador de fibroblastos humanos), CD45 (marcador de células hematopoyéticas) y CD34 (marcador de células endoteliales). Se obtuvo un porcentaje mayor del

98% de células CD90-positivas, descartándose la presencia de células endoteliales y encontrándose un porcentaje menor del 2% de células CD45-positivas.

Para los experimentos, las células sinoviales cultivadas se utilizaron desde el pase 3 hasta un máximo de 9 pases.

### 1.3. Estimulación celular

Antes de los experimentos, las células se deplecionaron en medio RPMI 0.5% SBF durante 24 h y, a continuación, los experimentos se realizaron también en RPMI 0.5% SBF (excepto en las determinaciones de ROS, que se realizan en RPMI 0% SBF). Este bajo porcentaje de SBF en el medio hace que las células se mantengan en un estado quiescente.

Oligomicina (OLI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se empleó como inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial. El uso de OLI para inducir disfunción mitocondrial en distintos tipos celulares es comúnmente descrito en la literatura científica (147-149). Además, se utilizó antimicina A (AA), un inhibidor del complejo III de la CRM y paraquat (PQ), un prooxidante mitocondrial comúnmente usado para inducir disfunción mitocondrial (Sigma-Aldrich). IL-1 $\beta$  (Sigma-Aldrich) se utilizó para inducir la respuesta inflamatoria. N-acetilcisteína (NAC; Sigma-Aldrich) se usó como un secuestrador general de ROS, mientras que mitoTEMPO (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA) se empleó como secuestrador selectivo de ROS mitocondrial. BAY-117085 (BAY; Calbiochem, Darmstadt, Alemania) se empleó por su capacidad de prevenir la activación de NF- $\kappa$ B. Diclofenaco (Sigma-Aldrich), un medicamento del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), se utilizó como inhibidor de COX-2. Como un inhibidor general de caspasas se utilizó Z-VAD-FMK (Sigma-Aldrich). Además, RSV (Sigma-Aldrich), un polifenol natural, se utilizó por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

## 2. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se determinó utilizando la sonda fluorescente tetrametilrodamina metil ester (TMRM; Molecular Probes, Eugene, OR). Éste es un compuesto cargado positivamente que se acumula en la mitocondria de manera indirectamente proporcional al  $\Delta\Psi_m$  y emite fluorescencia roja ( $\lambda \sim 590$  nm). Así, las mitocondrias polarizadas (sanas) acumulan más fluoróforo que aquellas que se encuentran en un estado de



despolarización, que no podrán retener éste en su interior y por tanto mostrarán una menor intensidad de fluorescencia (150).

Los sinoviocitos se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo. Tras ser deplecionados durante 24 h, se incubaron con los correspondientes estímulos, añadiéndose el TMRM (20 nM) en oscuridad durante los últimos 30 min del tiempo de incubación. A continuación, sin eliminar el fluoróforo del medio, las células se observaron directamente en la placa utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY) a un aumento de 10X. Para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en cada condición se tomaron 5 imágenes aleatorias de cada pocillo, y se analizaron con el software de procesamiento de imágenes ImageJ.

Como control positivo de un estímulo despolarizador de la mitocondria se utilizó el ionóforo valinomicina (5  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich).

### **3. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ATP**

El ATP producido por sinoviocitos normales fue cuantificado, mediante luminiscencia, utilizando el kit ATPlite (PerkinElmer, Waltham, MA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células, sembradas en placas blancas de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo, se sometieron a una solución de lisis durante 5 min en agitación, que además de lisis las células estabiliza el ATP. A continuación se añadió una solución sustrato que contiene luciferasa y D-luciferina, durante otros 5 min en agitación. En presencia de oxígeno, el ATP presente en las muestras reacciona con la D-luciferina dando lugar a la producción de luz. Tras adaptar la placa a oscuridad durante 10 min para evitar interferencia por fosforescencia del plástico, se cuantificó la luz emitida por las muestras en un luminómetro MicroBeta TriLux (PerkinElmer). La luz emitida es proporcional a la concentración de ATP en las muestras. La concentración de ATP se determinó incluyendo en la placa una curva patrón con concentraciones conocidas de ATP desde el blanco hasta 10  $\mu$ M.

## 4. DETECCIÓN DE ROS

### 4.1. Determinación de peróxido de hidrógeno intracelular

La determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular en los sinoviocitos humanos en cultivo se realizó mediante citometría de flujo utilizando el fluoróforo 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich). Esta molécula, no fluorescente, difunde a través de la membrana celular hasta el citoplasma. Allí, es escindida por esterasas intracelulares a DCFH, un compuesto que no puede atravesar la membrana plasmática y que por acción de ROS es oxidado a DCF, un compuesto fluorescente que puede ser cuantificado por citometría de flujo ( $\lambda_{\text{ex}}$  504nm;  $\lambda_{\text{em}}$  529nm).

El DCFH-DA, a pesar de ser una de las sondas más comúnmente utilizadas para la detección de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular y estrés oxidativo, presenta serias limitaciones y artefactos respecto a la cuantificación. En primer lugar, DCFH puede ser oxidado no sólo por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sino también por la interacción con radical hidroxilo, especies reactivas de nitrógeno, hierro o grupos proteicos hemo, entre otros. Además, el intermediario  $\text{DCF}^\cdot$  formado de la oxidación de DCFH reacciona rápidamente con  $\text{O}_2$  para formar  $\text{O}_2^\cdot$ . A partir de este radical se formará  $\text{H}_2\text{O}_2$ , provocando una amplificación artificial de la intensidad de la señal de fluorescencia (151).

En nuestro estudio, las células se sembraron en primer lugar en placas de 12 pocillos a una densidad de  $1.25 \times 10^5$  células/pocillo. Tras 24 h de depleción, se cambió el medio a RPMI sin SBF y se preincubaron con DCFH-DA 10  $\mu\text{M}$  durante 30 min. A partir de este momento, todo el proceso se llevó a cabo en oscuridad. A continuación, el medio se sustituyó por uno nuevo, lavando previamente los pocillos con solución salina, y se añadieron los estímulos correspondientes durante 15 min. Transcurrido el tiempo de estimulación, las células se tripsinizaron, se recogieron en tubos de citometría y se centrifugaron. Estas células fueron resuspendidas en PBS frío y analizadas mediante citometría de flujo, usando el canal FL1. Cada condición experimental fue procesada por duplicado. Los resultados se expresaron como la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) y se normalizaron respecto al valor de la condición basal.

#### 4.2. Determinación de superóxido intracelular y mitocondrial

Para estudiar la producción del radical  $O_2^-$  citosólico y mitocondrial se utilizaron fluoróforos derivados del etidio: dihidroetidio (DHE) y mitoSOX red, respectivamente (Molecular Probes). Estos compuestos, que presentan una fluorescencia basal azul, son capaces de reaccionar directamente con el radical  $O_2^-$  oxidándose a etidio, que emitirá una fluorescencia roja ( $\lambda \sim 590$  nm). MitoSOX es un derivado catiónico del dihidroetidio diseñado para la detección selectiva de  $O_2^-$  mitocondrial.

Al contrario que el DCFH-DA, los radicales derivados de estos fluoróforos no reaccionan con el  $O_2$  para formar  $O_2^-$ , por lo que no pueden amplificar la señal artefactualmente (151).

Para la detección de la fluorescencia emitida mediante microscopía, los sinoviocitos se sembraron en placas desmontables de 8 pocillos a una densidad de  $1.5 \times 10^4$  células/pocillo. Tras la depleción de 24 h en RPMI 0.5% SBF, el medio se cambió por HBSS suplementado con  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  (Gibco). Se añadió DHE (10  $\mu$ M) o mitoSOX (1  $\mu$ M) a los pocillos junto con el correspondiente estímulo durante 30 min a 37 °C en oscuridad. A continuación, se eliminó el medio y los pocillos se lavaron dos veces con PBS 1X pH 7.4 antes de fijar las células durante 15 min con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente y en oscuridad. Las células se lavaron de nuevo y se incubaron con DAPI (10  $\mu$ g/ml) durante 10 min para contrateñir los núcleos. Tras un último lavado, la placa se desmontó para obtener solamente el portaobjetos con las células adheridas, y se procedió al montaje de éste utilizando Glicergel (DAKO). Se tomaron cinco imágenes de fluorescencia de cada condición usando un microscopio Nikon Eclipse Ti a una magnificación de 10X. Posteriormente, se analizaron con el software ImageJ para cuantificar la intensidad de fluorescencia.

#### 5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE ARN

Para los estudios de expresión génica se extrajo ARN utilizando el reactivo Trizol y se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc). Posteriormente, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Estos procesos son descritos en detalle a continuación.

### 5.1. Extracción de ARNm y tratamiento con ADNasa

El ARN total se aisló a partir de  $5 \times 10^5$  células por condición (procedentes de 2 pocillos de placa de 6). Para extraer ARN celular, se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El reactivo Trizol es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que provoca la lisis celular mientras protege la integridad del ARN. Cuando se añade cloroformo al lisado celular se provoca la separación de una fase acuosa, en la que se encuentra el ARN, de una fase orgánica. La fase acuosa se recupera a tubos nuevos, en donde se provoca la precipitación del ARN mediante una incubación con isopropanol. Por último, se lava el ARN con etanol 75% y se deja secar brevemente el precipitado para poder disolverlo en agua libre de ARNasas a 55 °C.

El ARN obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro *NanoDrop ND 1000* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) a 260 nm. La pureza del ARN se determinó a partir del ratio entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm ( $A_{260/280}$ ), que debe ser de aproximadamente 2. Ratios menores son indicativos de contaminación del ARN con proteínas, compuestos fenólicos u otros contaminantes que absorben a 280 nm. Un segundo indicador de la pureza del ARN lo constituye el ratio 260/230, que debe ser ligeramente superior al anterior (entre 2.0 y 2.2). Un ratio por debajo de estos valores indica contaminación con compuestos que absorben a 230, típicamente fenol u otros compuestos provenientes del proceso de extracción.

A continuación, 1 µg de ARN (con ratios aproximados de pureza = 2) se trató con 1 µl de desoxirribonucleasa I 1U/µl (DNasa I; Invitrogen). Se añadió 1 µl de tampón de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl) y se completó hasta 10 µl con agua libre de ARNasas. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, y se detuvo la reacción añadiendo 1 µl de EDTA 25 mM pH 8.0 para posteriormente incubar durante 10 min a 65 °C.

### 5.2. Retrotranscripción de ARN a ADNc

La síntesis y amplificación de ADNc a partir de las muestras de ARN se realizó usando el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* kit (Roche Diagnostics, Abingdon, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se preparó en primer lugar la reacción añadiendo 1 µl de cebadores oligo (dT) (2.5 µM) y 1 µl de agua libre de ARNasas a 1 µg de ARN (11 µl resultantes del tratamiento con ADNasa) y se aseguró la desnaturalización del ARN con una incubación de

10 min a 65 °C. A continuación, para llevar a cabo la síntesis de ADNc, se añadieron 4 µl de tampón de reacción 5X (40 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5 µl de inhibidor de ARNasa (40 U/µl), 2 µl de mezcla de desoxinucleótidos (10 mM) y 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa (20 U/µl). La mezcla (20 µl) se sometió a una incubación de 30 min a 55 °C seguida de otra breve incubación de 5 min a 85 °C para inactivar la enzima. Las muestras con ADNc se guardaron a -20 °C hasta el momento de llevar a cabo la PCR a tiempo real.

### 5.3. PCR a tiempo real

En placas de PCR de 96 pocillos (LightCycler 4800, Roche Diagnostics) se realizó la mezcla de 2 µl de ADNc con 5 µl de SYBR Green (LightCycler 4800 SYBR Green I Master kit, Roche Diagnostics), 0.25 µl de cada cebador 20 µM (sentido y antisentido) y 2.5 µl de agua de PCR para completar hasta 10 µl totales. La PCR se llevó a cabo en el termociclador Real Time LightCycler (Roche Diagnostics).

Las condiciones fueron las siguientes: una primera etapa de incubación a 95 °C durante 10 min para la activación de la *hot start* Taq ADN polimerasa. A continuación, se llevan a cabo 40 ciclos de amplificación que consisten en una primera etapa de 10 s a 95 °C para la desnaturalización de las dobles cadenas de ADN, seguida de una bajada de temperatura de 10 s a 60 °C para permitir el anillamiento de los cebadores con la secuencia diana del ADN de cadena única y una etapa de extensión de 10 s a 72 °C, en la que la ADN polimerasa realiza la síntesis de la nueva hebra de ADN. El SYBR Green es un compuesto fluorescente que se intercala entre las bases de ADN de doble cadena, por lo que a medida que aumenta el número de copias del producto de PCR, aumenta la fluorescencia emitida. Mediante la herramienta de cuantificación de expresión relativa del software LightCycler 480, la intensidad de la señal de fluorescencia es cuantificada y se realizan comparaciones entre los grupos basales y tratados teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y la normalización respecto al gen de referencia.

El diseño de los cebadores utilizados para cada gen de interés y de referencia se realizó utilizando la herramienta informática *Primer3* y fueron manufacturados por Sigma. En la Tabla 2 se detallan las características de todos los cebadores utilizados.

La expresión de COX-2 e IL-8 se normalizó utilizando como gen de referencia la porphobilinógeno deaminasa (PBGD). Para VEGF, el gen de referencia utilizado fue la

hipoxantina fosfo-ribosil transferasa 1 (HPRT). En ambos casos, los genes de referencia fueron elegidos de entre una batería de genes candidatos por la similitud de sus niveles de expresión con los de los genes diana y por no verse modulados bajo ninguna de las condiciones estudiadas. Cada punto de la PCR se hizo por duplicado. Los datos se expresan como ratio de incremento respecto al basal (normalizado a 1).

**Tabla 2. Cebadores empleados en la PCR a tiempo real.**

GEN DIANA	CEBADOR SENTIDO (5' – 3')	CEBADOR ANTISENTIDO (5' – 3')	AMPLICÓN (pb)
COX-2	TGGGAAGCCTTCTCTAACCTC	TCAGGAAGCTGCTTTTACCTT	103
IL-8	AGACAGCAGAGCACACAAGC	ATGGTTCCTCCGGTGGT	62
VEGF	GAGTGGTTGACCTTCTCCA	GATCCTGCCCTGTCTCTCTG	72
PBGD	TTGTATGCTATCTGAGCCGTCTA	AGCTATGAAGGATGGGCAAC	70
HPRT	TGACCTGATTTATTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	102

Debido a que el SYBR Green se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena, fue necesario realizar las curvas de *melting* o fusión, características del producto de PCR (dependen del tamaño y composición del amplicón). Para ello, se realizó una etapa más de desnaturalización de 5 s a 95 °C, seguida de 1 min a 65 °C para que todas las hebras hibridasen de nuevo, alcanzando así el máximo de fluorescencia. A continuación se elevó lentamente la temperatura hasta 97 °C. La temperatura a la que la mitad de las hebras de ADN se encuentran disociadas es la temperatura de *melting* o temperatura de fusión ( $T_m$ ). Esta  $T_m$  debe ser la misma en cada gen analizado, por lo que este dato permite descartar aquellas muestras en donde se haya amplificado algo distinto a nuestro amplicón (la  $T_m$  sería distinta debido a que se trata de uniones inespecíficas del cebador, *primer dimers*, etc).

## 6. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA DE COX-1/COX-2 MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la cuantificación proteica de COX-1/COX-2 mediante citometría de flujo, las células se sembraron en placas de 6 pocillos, a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/pocillo. Tras 24 h de depleción, los sinoviocitos se trataron con los correspondientes estímulos durante 6 h. Finalizado el tiempo de incubación, las células se recogieron mediante tripsinización. A continuación se lavaron 2 veces con solución salina y se permeabilizaron con una solución de saponina (Sigma-Aldrich) al 0.2% en solución FACS Lysing (BD, Becton Dickinson, Mountain View,

CA) durante 10 min. Las células permeabilizadas se centrifugaron y se lavaron 2 veces con una solución de bloqueo de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS 1X. Tras el bloqueo, las células se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con 10  $\mu$ l de anti-COX-1/anti-COX-2 marcados respectivamente con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) (BD) diluidos en 20  $\mu$ l de PBS 1X. Tras la incubación, las células se sometieron a dos lavados con PBS + 1% BSA y se resuspendieron en PBS 1X para ser analizadas en un citómetro de flujo FACScalibur (BD) en los canales FL1 (para detectar la fluorescencia emitida por FITC) y FL2 (para detectar PE).

Los datos obtenidos se expresaron como la mediana de la intensidad de fluorescencia y se normalizaron respecto al valor de la condición basal (=1).

## 7. ELISA

La cuantificación de mediadores inflamatorios secretados al medio de cultivo se realizó mediante ELISA. En primer lugar, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo. Tras el tiempo de depleción y de estimulación correspondiente, se centrifugaron las placas durante 10 min para evitar recoger cualquier célula despegada, y se recogió el sobrenadante de cada pocillo (condiciones experimentales por duplicado). Los sobrenadantes se guardaron a -20 °C hasta el momento de la determinación por ELISA.

### 7.1. ELISA de PGE<sub>2</sub>

Para la determinación de PGE<sub>2</sub> liberada al medio se utilizó el kit *Amersham Prostaglandin E<sub>2</sub> Enzymeimmunoassay System* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se trata de un ensayo competitivo en el que la PGE<sub>2</sub> de las muestras compite con una cantidad fija de PGE<sub>2</sub> marcada con peroxidasa por los sitios de unión a anticuerpo anti-PGE<sub>2</sub>. La mezcla formada por las muestras más la solución de PGE<sub>2</sub> marcada con peroxidasa se incuba con anti-PGE<sub>2</sub> proveniente de ratón en la placa de ELISA que está revestida de IgG anti-ratón de oveja. Tras una incubación de 1 h a temperatura ambiente, se realizan 4 lavados de los pocillos y se incuban con sustrato de peroxidasa (TMB, 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina) durante 30 min. Durante este tiempo, la peroxidasa conjugada con la PGE<sub>2</sub> que ha conseguido unirse a los anticuerpos en la placa reacciona con el sustrato dando lugar a una reacción colorimétrica, que se detiene con ácido sulfúrico 1M. En este punto, se puede leer

la absorbancia de las muestras a 450 nm usando el espectrofotómetro Multiskan Plus (MTX Lab Systems, Vienna, VA). Debido a que el ensayo es competitivo, a mayor absorbancia detectada, menor es la cantidad de PGE<sub>2</sub> en las muestras. La concentración de PGE<sub>2</sub> en las muestras se extrapoló a partir de una curva patrón con un rango de 2.5 a 320 pg/pocillo, lo que atribuye al ensayo una sensibilidad de 50-6400 pg/ml. Los resultados se expresaron como pg/5×10<sup>4</sup> células.

## **7.2. ELISA de IL-8**

La cuantificación de IL-8 liberada al medio se realizó con un kit comercial de ELISA (Immunotools, Friesoythe, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, las placas se revistieron con una solución de anticuerpo anti-IL-8 proveniente de conejo y se incubaron toda la noche para asegurar la unión al plástico. Se bloquearon los pocillos con un tampón de bloqueo de PBS con un 3% de BSA y a continuación se incubaron las muestras y la curva patrón en los pocillos durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos 5 veces, se añadió una solución de anti-IL-8 biotinilado y se incubó durante 1 h. A continuación, tras otra ronda de lavados, se añadió un conjugado de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano a cada pocillo y se incubó durante 30 min antes de lavar y añadir el sustrato de la peroxidasa, TMB. La estreptavidina se une con gran afinidad a la biotina del anticuerpo del paso anterior, y la peroxidasa interacciona con el TMB dando lugar a una reacción colorimétrica. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1 M y la absorbancia de la placa fue registrada en un espectrofotómetro Multiskan Plus a 450 nm. El rango de detección del ensayo es de 1.0 a 240 pg/ml. Los resultados se expresaron como pg/5 x 10<sup>4</sup> células.

## **8. ESTUDIOS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN**

### **8.1. Inmunofluorescencia de la subunidad p65**

Para la detección de p65, una subunidad del factor de transcripción NF-κB, las células se sembraron en placas desmontables de 8 pocillos a una densidad de 1.5×10<sup>4</sup> células/pocillo. Tras el tiempo de estimulación, los pocillos se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 7.4 y a continuación las células se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Tras lavar nuevamente, se incubó con una solución de bloqueo (5% suero de cabra; 0.3% Triton X-100; en PBS 1X pH 7.4) durante 1 h. A continuación, se incubó con el anticuerpo



primario de ratón anti-p65 humano (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA; 1:25) durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar 3 veces con PBS 1X, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario de cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG de ratón (Life Technologies; 1:500) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo, se incubaron las células con DAPI (10 µg/ml, Sigma-Aldrich) para localizar los núcleos, y, tras un último lavado, se procedió al montaje del portaobjetos con Glicergel. Se tomaron imágenes de las preparaciones con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti a 10X.

## 8.2. Extracción nuclear

La extracción de proteínas nucleares se realizó a partir de sinoviocitos normales sembrados en placas de 6 pocillos a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/pocillo. Se utilizó para ello un kit comercial de extracción nuclear (Affymetrix, Santa Clara, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer lugar, las células se lavaron con PBS 1X frío y se añadió 1 ml de tampón A (hipotónico) suplementado con ditioneitol (DTT) e inhibidores de fosfatasa y proteasas a cada pocillo de placa de 6. Las placas se mantuvieron en agitación a 200 rpm durante 10 min rodeadas de hielo. En este paso, el tampón A provoca el aumento de volumen citoplasmático y la rotura de la membrana plasmática mientras mantiene la integridad de la membrana nuclear. La mezcla se recogió a tubos de centrifuga de 1.5 ml y se centrifugaron a  $14.000 \times g$  durante 3 min a 4 °C. El precipitado obtenido, constituido por núcleos celulares, se incubó con 15 µl de tampón B suplementado también con DTT e inhibidores de proteasas y fosfatasa durante 1 h en hielo para lisar los núcleos y liberar las proteínas nucleares. Por último, las muestras se centrifugaron a  $14.000 \times g$  durante 5 min a 4 °C para eliminar los restos de membrana nuclear, que precipitan.

Los extractos proteicos obtenidos se cuantificaron mediante una variante del método de Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Pty, Ltd, Hercules, CA). Se realizó una curva patrón de 0 a 1.43 mg/ml de BSA y las muestras se diluyeron 1/3. A la curva patrón y a las muestras se le añadió 25 µl de solución alcalina de tartrato de cobre (reactivo A) y 200 µl de reactivo de Folin diluido (reactivo B). Tras una incubación de 15 min, la absorbancia de cada punto se midió con un espectrofotómetro a 750 nm. A la absorbancia de las muestras se le restó la absorbancia del reactivo solo en el que están resuspendidas. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

### 8.3. Ensayo de retardo en gel

El ensayo de retardo en gel, o EMSA por sus siglas en inglés (*Electrophoretic-Mobility Shift Assay*), se realizó usando el kit de EMSA “Gel Shift” (Affymetrix) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detectar la capacidad de unión del factor de transcripción de los extractos nucleares a la sonda específica correspondiente biotinilada. Cuando las muestras proceden de sinoviocitos en donde el estímulo ha inducido la activación del factor de transcripción, éste se encuentra presente en el extracto nuclear. En este caso, en un gel de electroforesis, el complejo sonda-factor de transcripción migra más lento que la sonda libre, mostrando una banda retardada.

Los extractos nucleares de las muestras (4 µg) se incubaron con 1 µl Poly d(I-C) (un competidor no específico de ADN), 2 µl de tampón de unión y se completó con agua destilada hasta 6 µl. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para permitir que tuviesen lugar las uniones no específicas a los fragmentos de Poly d(I-C). A continuación se añadió 1 µl de sonda biotinilada específica para la unión del factor de transcripción a estudio y se incubó durante 30 min a 15 °C en un termociclador.

Las muestras se mezclaron con 1 µl de tampón de carga y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% [500 µl tampón Tris/Borato/EDTA (TBE) 10X, 2 ml solución Acrilamida/Bisacrilamida 30% (Bio-Rad), 312 µl Glicerol 80% (Sigma), 7.2 ml agua destilada, 150 µl persulfato amónico (Sigma), 10 µl N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamina (Sigma)]. Cuando las muestras se cargaron en los pocillos, se realizó la electroforesis a 120 V durante 55 – 60 min (hasta que el frente llegó a aproximadamente 1 cm del final del gel) en TBE 0.5X a 4 °C.

A continuación, entre 2 papeles absorbentes, se transfirió el gel a una membrana de nailon cargada positivamente con un tamaño de poro de 0.45 µm Hybond-N<sup>+</sup> (GE Healthcare), todo previamente hidratado con TBE 0.5X. La transferencia se realizó con un sistema eléctrico de transferencia semi-seca (Trans-Blot, Bio-Rad) a 12 V durante 45 min. Los oligos se fijaron a la membrana en un UV-crosslinker Bio-Link (Vilber Lourmat, Paris, Francia) sometiendo la membrana a rayos ultravioletas durante 5 min.

A continuación, la membrana se incubó con una solución de bloqueo durante 15 min en agitación, se le añadió estreptavidina-HRP y se continuó la incubación durante 15 min. Tras el

marcaje, se realizaron 3 lavados de 8 minutos con tampón de lavado y se incubó con solución de revelado durante 5 min. Para el revelado de la membrana, ésta se puso en contacto con la solución sustrato durante 5 minutos y se reveló usando el sistema de imagen quimioluminiscente Las-3000 (Fujifilm, Stanford, CT).

En la imagen se apreció una banda retardada en aquellos pocillos donde la muestra presentó activación del factor de transcripción. La intensidad de la banda está directamente relacionada con el grado de activación de dicho factor. La intensidad de la activación del factor de transcripción se determinó cuantitativamente densitometrando las bandas con el software ImageQuant 5.2 (GE Healthcare).

Se realizaron controles de la especificidad de la unión mediante ensayos de competición con una sonda “fría” (no marcada) en 100 veces de exceso molar, de manera que se desplaza la unión de la sonda marcada. Como consecuencia, el ensayo de competición con sonda fría debe mostrar una “desaparición” de la banda respecto al mismo ensayo con sonda marcada.

## 9. ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular en respuesta a los estímulos utilizados se determinó usando el kit comercial de muerte celular FITC-Anexina V/ioduro de propidio (IP) (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La fosfatidilserina es un fosfolípido que se localiza normalmente en la cara citosólica de la membrana plasmática en células vivas. Cuando se desencadena el proceso de apoptosis, la fosfatidilserina se trasloca a la cara externa de la membrana, quedando expuesta en la superficie celular y constituyendo una señal de reconocimiento para la fagocitosis. Este ensayo se basa en la utilización de la anexina V, una proteína de unión a fosfolípidos con gran afinidad por la fosfatidilserina. Cuando la anexina V se marca con un fluoróforo como FITC puede identificar las células apoptóticas mediante su unión a la fosfatidilserina expuesta en su superficie.

Los sinoviocitos ( $1.25 \times 10^5$  células/pocillo) se tripsinizaron, se lavaron con suero salino frío y se incubaron con anexina V (marcada con FITC) y con IP durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo, registrando la intensidad de fluorescencia emitida en los canales FL1 (FITC) y FL3 (IP). Las células

vivas presentan bajos niveles de fluorescencia, mientras que las células en proceso de apoptosis emiten fluorescencia verde (por la unión de anexina V) y las células muertas emiten tanto fluorescencia verde como roja (por ser permeables al IP).

Como control positivo de inductor de apoptosis se utilizó la combinación de actinomicina D (1 µg/ml) + TNFα (10 ng/ml) (152, 153).

## **10. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS**

El ensayo de formación de tubos se realizó para evaluar la capacidad de los sinoviocitos de producir mediadores con propiedades angiogénicas (IL-8, MCP-1, VEGF...). Un método para determinar esta capacidad es cuantificando la formación, por parte de células endoteliales, de tubos o estructuras tubulares similares a capilares. Las células endoteliales presentan de manera intrínseca una tendencia a la formación de estructuras tubulares tridimensionales cuando se encuentran embebidas en una matriz. Sin embargo, la cantidad, longitud y calidad de los tubos formados dependerá de los estímulos angiogénicos presentes en el medio.

### **10.1. Cultivo de células endoteliales**

Para este ensayo se utilizaron células endoteliales humanas de arteria coronaria (Culture Collections, Public Health England, Salisbury, UK) que, tras su descongelación, se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Para una mejor adherencia y crecimiento de las células endoteliales, los frascos de cultivo fueron previamente gelatinizados. Para ello, los frascos vacíos se incubaron con gelatina 1% durante unos 10 min y, a continuación, ésta se retiró. Esta incubación confiere un sustrato de buena calidad en el frasco para el cultivo de las células endoteliales. A continuación, las células se sembraron a una densidad aproximada de  $5 \times 10^5$  células por frasco en medio de crecimiento de células endoteliales de arteria coronaria (Culture Collections), y se dejaron crecer cambiando el medio de cultivo cada 2 días. Cuando las células alcanzaron aproximadamente una confluencia del 80-90% se tripsinizaron hacia el siguiente pase o para el procedimiento experimental.

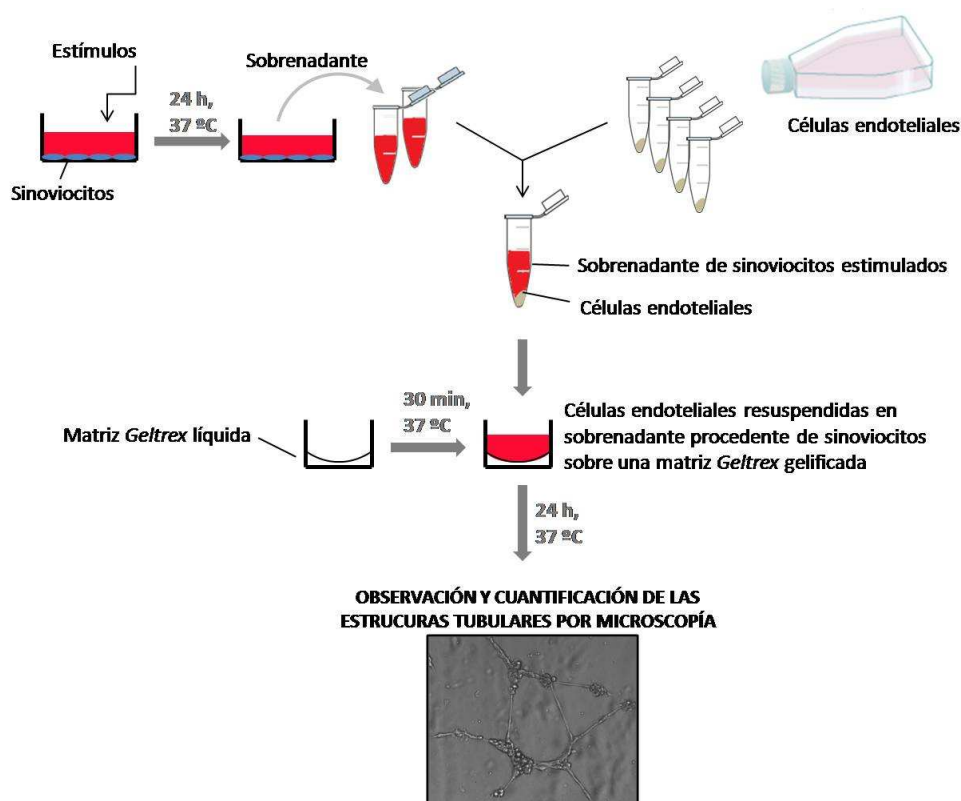
### **10.2. Desarrollo del ensayo de formación de tubos**

En primer lugar, los sinoviocitos se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/pocillo. Tras la depleción, se incubaron los sinoviocitos en 1 ml de RPMI 0.5% SBF

con los estímulos correspondientes durante 24 h y, transcurrido este tiempo, se recogieron los sobrenadantes a tubos pequeños de centrífuga en alícuotas de 500  $\mu$ l. Los sobrenadantes se conservaron congelados a -80 °C hasta el momento del ensayo de formación de tubos.

Para el ensayo de formación de tubos se usó una matriz en gel (*Geltrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix*, Invitrogen). La matriz se descongeló lentamente en hielo a 4 °C durante toda la noche. En una placa de 24 pocillos, se añadieron 150  $\mu$ l de la matriz líquida *Geltrex* a cada pocillo y la placa se incubó durante exactamente 30 min en la estufa a 37 °C para permitir la gelificación de la matriz. Durante este tiempo, las células endoteliales se tripsinizaron, se recogieron y se centrifugaron. Las células precipitadas se resuspendieron en solución salina, se determinó su concentración y se repartieron en tubos de centrífuga a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por tubo. Tras otra centrifugación, se retiró el medio y se añadieron 400  $\mu$ l de los sobrenadantes de sinoviocitos a testar a cada tubo. Una vez gelificada la matriz de los pocillos, se añadieron las células endoteliales resuspendidas en el sobrenadante obtenido de los sinoviocitos y se incubó en la estufa durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las células endoteliales se observaron en un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti a 10X y se cuantificó la longitud de los tubos formados en 5 campos distintos por pocillo (en  $\mu$ m tubo/mm<sup>2</sup>) utilizando el software Nis Elements (Nikon Instruments, Inc.).

Figura 17: Esquema del procedimiento para la realización del ensayo de formación de tubos.



Para determinar la influencia de VEGF o IL-8 en los resultados obtenidos, se realizaron experimentos de neutralización. Para ello, antes de poner en contacto los sobrenadantes de sinoviocitos con las células endoteliales, éstos se incubaron con 1  $\mu\text{g}$  de anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX) o 0.02  $\mu\text{g}$  de anti-IL-8 (Invitrogen) durante 1 h a 37 °C. Como control, otros sobrenadantes se incubaron con la misma concentración de IgG no específica en las mismas condiciones. A continuación, se llevó a cabo el ensayo de formación de tubos normalmente.

## 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad PRISM versión 5 (GraphPad Software, San Diego, CA), realizándose análisis para muestras dependientes. Para

comparaciones dos a dos se utilizó el test de Wilcoxon, mientras que para comparaciones múltiples se realizó un ANOVA seguido del test post-hoc de Friedman. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P \leq 0.05$ .

## **B. Estudio del papel de Nrf2 en la capacidad de angiogénesis en células endoteliales de arteria coronaria humanas en cultivo**

### **1. CULTIVO CELULAR**

Las células endoteliales de la arteria coronaria (CEACs) humanas primarias (obtenidas de Cell Applications, Inc., San Diego, CA) se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> revestidos con colágeno para mejorar su adherencia y crecimiento. Para su mantenimiento y crecimiento se utilizó el medio de cultivo celular MesoEndo (Cell Applications), suplementado con 10% de SBF. En función de los experimentos, las células se incubaron en medio Opti-MEM o 200PRF sin rojo fenol (Life Technologies).

En los experimentos, se utilizaron factores proangiogénicos recombinantes humanos para estimular las propiedades angiogénicas de las células endoteliales: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; 100 ng/ml) y factor de crecimiento insulínico (IGF-1; 500 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### **2. SILENCIAMIENTO DE NRF2 Y SOBREEXPRESIÓN DE KEAP1**

#### **2.1. Vectores para la inhibición de Nrf2**

Para inhibir la ruta de señalización de Nrf2 se transfectaron las células con plásmidos pRS (plásmido silenciador retroviral) codificantes para un ARN de horquilla corto (ARNhc) que silencia la expresión de Nrf2 (Origene, Rockville, MD). Se utilizaron 4 construcciones diferentes del ARNhc que hibridan en distintas regiones de múltiples variantes de splicing alternativo del ARNm de Nrf2, para asegurar la máxima inhibición de éste.

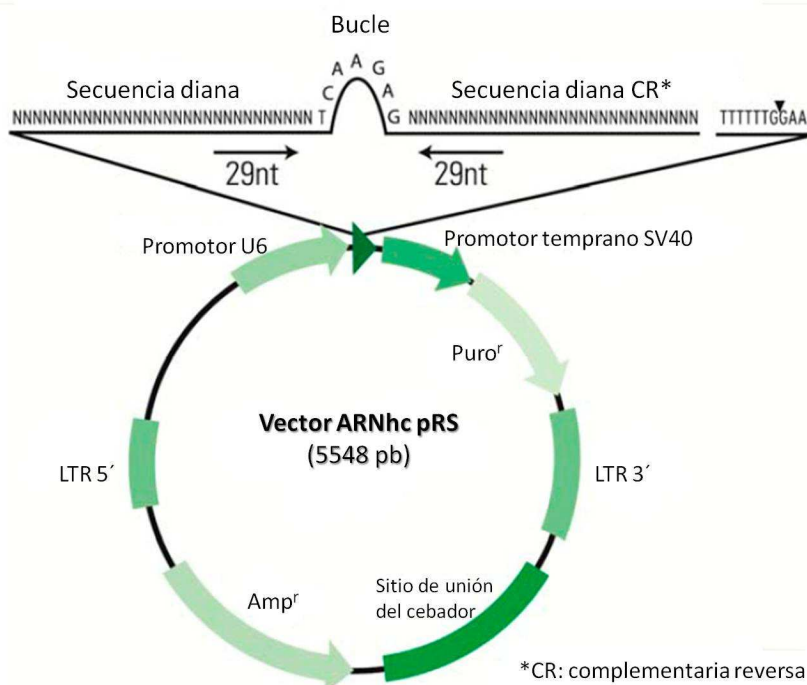
Como control, se utilizó un plásmido sin capacidad de inhibir ninguna ruta. En lugar de la secuencia diana, este plásmido presenta una secuencia control (SC) aleatoria, no complementario a ningún transcrito conocido ni codificante para ninguna proteína.

Además, como manera adicional de inhibir la actividad de Nrf2, se utilizó un plásmido con un inserto de ADNc de Keap1 corriente abajo del promotor. Este plásmido provoca un



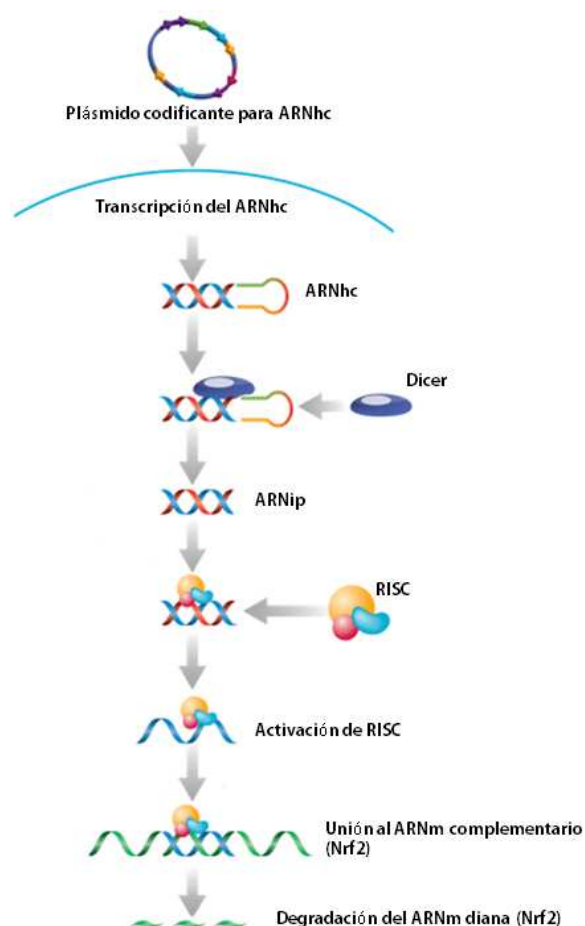
aumento de la transcripción y síntesis de la proteína inhibidora Keap1, lo que a su vez se refleja en una inhibición de la actividad de Nrf2.

En la Figura 18 se muestra el esquema del plásmido utilizado como vector.



**Figura 18: Mapa génico del vector plasmídico utilizado en el silenciamiento de Nrf2.** El plásmido pRS presenta un inserto de una secuencia de 29 nucleótidos específica de Nrf2 corriente abajo del promotor U6, un bucle de 7 nucleótidos y la secuencia de 29 nucleótidos complementaria en la posición reversa, seguida por una secuencia de terminación. Además, el plásmido contiene un gen de selección de resistencia a ampicilina (AMP<sup>r</sup>).

Los ARN de horquilla cortos, al transcribirse, se pliegan en forma de horquilla debido a apareamientos intracatenarios que contienen segmentos de complementariedad imperfecta que forman un bucle. Están constituidos por aproximadamente 70 nucleótidos, pero cuando son procesados por la enzima endorribonucleasa Dicer se elimina el bucle y el ARN interferente pequeño (ARNip) resultante se une al complejo RISC (*complejo silenciador inducido por ARN*), de donde se libera un fragmento monocatenario de 29 nucleótidos, que será el responsable de la unión al ARNm complementario para su silenciamiento (Figura 19).



**Figura 19: Mecanismo de acción del ARNhc de Nrf2.** El ADN plasmídico con la secuencia codificante para ARN de horquilla corto (ARNhc) dirigido a Nrf2 se incorpora a la célula mediante transfección. Una vez en el núcleo, la polimerasa III se une a su promotor U6 y realiza la transcripción del ARNhc, que da lugar a un transcrito que adopta forma de horquilla. A continuación, el ARNhc es exportado al citoplasma donde es escindido por la endorribonucleasa Dicer, que elimina el bucle dando lugar a un ARN interferente pequeño (ARNip) bicatenario. Este ARNip se une a RISC (complejo silenciador inducido por ARN), que degrada una de las cadenas. La otra cadena de ARNip guía al complejo RISC hasta el ARNm diana de Nrf2, que presenta una secuencia complementaria. La unión de RISC al ARNm diana provoca la degradación de éste o, en caso de una complementariedad imperfecta, a la represión de la traducción, dando lugar en cualquier caso al silenciamiento de Nrf2.

## 2.2. Clonaje, amplificación y purificación de los plásmidos

### 2.2.1. Transformación

Como paso previo a la utilización de los plásmidos adquiridos para el silenciamiento de Nrf2, éstos debieron de ser amplificados en células competentes. Para ello, en primer lugar se realizó la transformación bacteriana en células competentes *E. coli* TOP10. Para ello, 1 µg del

plásmido de interés se mezcló cuidadosamente en un vial de 50  $\mu$ l de células TOP10 competentes (Invitrogen) y se incubaron en hielo durante 30 min. A continuación, para que el ADN entre en la célula, se aplicó un choque térmico introduciendo el tubo en un baño a 42 °C durante 30 s e inmediatamente se introdujo en hielo durante 2 min. Después se le añadieron 500  $\mu$ l de medio de cultivo bacteriano LB Miller autoclavado, en adelante LB (las siglas LB proceden de *Lysogeny Broth*). Los tubos se dejaron en un agitador a 37 °C durante 30 min y a continuación se sembraron entre 100  $\mu$ l - 300  $\mu$ l de este medio en distintas placas de cultivo bacteriano de LB-agar (Sigma) complementado con ampicilina (Amp). Tras una breve incubación de 5 - 10 min a temperatura ambiente, las placas se incubaron invertidas a 37 °C durante la noche.

**Tabla 3: Composición de las soluciones necesarias en el proceso de transformación.**

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
LB Miller	5 g/l de extracto de levadura 10 g/l de NaCl 10 g/l de triptona *Autoclavar* 50 $\mu$ g/ml Amp
LB-agar	5 g/l de extracto de levadura 10 g/l de NaCl 10 g/l de triptona 15 g/l agar * Autoclavar* 50 $\mu$ g/ml Amp

### 2.2.2. Amplificación

Al día siguiente, de las placas en donde existían colonias aisladas (y no un césped bacteriano) se recuperó una única colonia que se inoculó en un matraz pequeño con 10 ml de LB + Amp y de nuevo este cultivo se incubó en un agitador a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche. Tras la incubación, este cultivo iniciador (o inóculo inicial) se añadió a un matraz más grande con 700 ml de LB + Amp y se devolvió al agitador a 37 °C y 200 rpm hasta que la densidad óptica ( $\lambda$  = 600 nm) del cultivo llegó a 0.7 - 0.9 (aproximadamente 4 - 5 h en función del crecimiento del inóculo inicial). En este momento, se añadió cloranfenicol (90  $\mu$ g/ml en etanol 100%; Sigma) al cultivo para aumentar el rendimiento de la amplificación de los plásmidos, ya que este antibiótico inhibe la síntesis de proteínas (es un bacteriostático) pero no la replicación del ADN,

por lo que se detiene la multiplicación bacteriana pero continúa la replicación del plásmido. A continuación, se dejó incubando toda la noche. Por último, se transfirió todo el medio de cultivo a frascos grandes de centrifuga para recuperar las células, y se centrifugó a 4000 rpm durante 25 min a 4 °C.

### **2.2.3. Preparación del plásmido a gran escala mediante lisis alcalina**

Para la recuperación del plásmido, el precipitado de células se resuspendió en primer lugar en 30 ml de tampón STE pH 7.8 frío (NaCl 100 mM, Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM) y se transfirió a frascos de centrifuga de 250 ml. Usando el rotor Sorvall SL-250T (Thermo Scientific), se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. A continuación, las células se resuspendieron e incubaron durante 5 – 10 min a temperatura ambiente en 10 ml de solución A pH 8.0 (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM, EDTA 10 mM). El EDTA es un quelante de metales divalentes, especialmente magnesio y calcio, de manera que desestabiliza la membrana celular. Además, inhibe la acción de las ADNasas. La glucosa, por su parte, se usa para mantener la osmolaridad. En el momento de usar, a esta solución, además, se le añade 1.5 ml de lisozima (10 mg/ml), que ayudará a romper la pared bacteriana. Tras la incubación, se añadieron 20 ml de solución B, una solución de lisis altamente alcalina compuesta por NaOH 0.2 N y SDS (dodecilsulfato sódico) 1%, se agitó la mezcla mediante inversión y se incubó en hielo durante 20 min. En esta etapa, el SDS permeabiliza la membrana celular y el NaOH desnaturaliza el ADN cromosómico y las proteínas mientras que el plásmido permanece estable. A continuación, se añadieron 20 ml de solución C (acetato potásico 3M con ácido acético glacial), se agitaron las muestras y se realizó otra incubación en hielo de 20 min. El ADN cromosómico, pesado y desnaturalizado, es insoluble en altas concentraciones de sal y precipita. Tras la incubación, los frascos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante, que contiene el ADN plasmídico, a nuevos frascos de centrifuga de 250 ml y se repitió el paso de centrifugación. De nuevo, se recuperaron los sobrenadantes a nuevos frascos de 250 ml. Se precipitó el ADN añadiendo un volumen de isopropanol equivalente al 60% del volumen recuperado. La precipitación se realizó a -20 °C durante aproximadamente 2 h. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min y el ADN precipitado se lavó con 10 ml de etanol 70%, que elimina los restos de sales y permite disolver el ADN con mayor facilidad. Tras una centrifugación de 10 min a 10000 rpm a 4 °C, el ADN se resuspendió en 10 ml de tampón TE 1X filtrado (0.22 µm) y se

transfirió a tubos de centrifuga de 50 ml. Para obtener una mayor pureza, se realizó una desproteinización del ADN mediante extracción fenólica. Para ello, en primer lugar se añadieron 6 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se agitó hasta conseguir una emulsión y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min para que se separase la fase acuosa de la orgánica. La fase acuosa superior se recogió a un tubo nuevo y se le añadieron 3 ml de cloroformo, mezclando por inversión. Se repitió la centrifugación y de nuevo se recuperó la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Por último, se precipitó el ADN añadiendo 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100%. La precipitación tuvo lugar durante al menos 60 min (preferiblemente toda la noche) a -20 °C y, transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min a 4 °C. El ADN precipitado obtenido se resuspendió en 500 µl de TE 1X y se guardó a -20 °C en tubos de 1.5 ml.

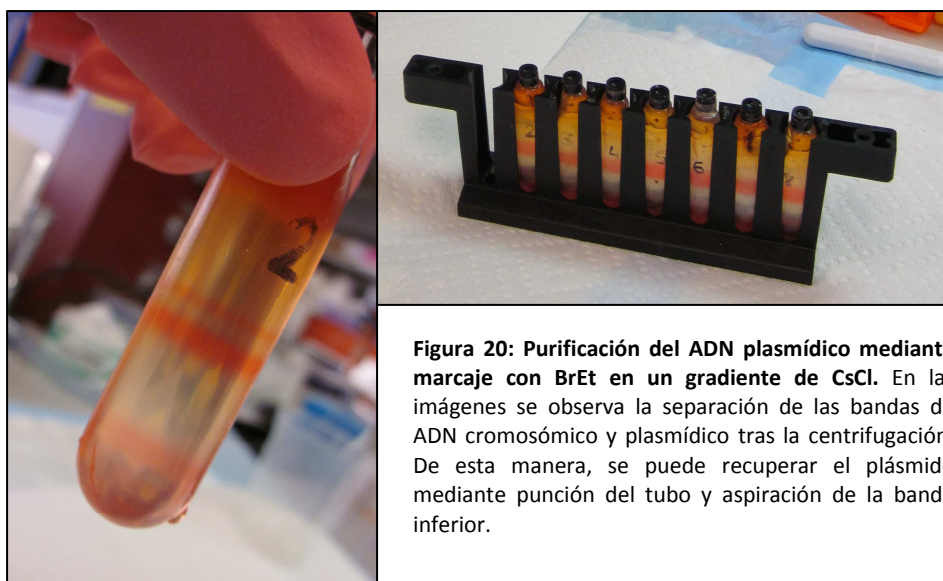
**Tabla 4: Composición de las soluciones necesarias en el proceso de preparación de plásmido.**

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	PREPARACIÓN
Tampón STE	100 mM NaCl 10 mM Tris-Cl pH 7.8 1 mM EDTA	10 ml NaCl 5 M 5 ml Tris-Cl pH 7.8 1 M 1 ml EDTA 0.5 M H <sub>2</sub> O hasta 500 ml
Solución A	50 mM Glucosa 25 mM Tris-Cl pH 8.0 10 mM EDTA	23 ml Glucosa 20% 12.5 ml Tris-HCl pH 8.0 1 M 10 ml EDTA 0.5 M H <sub>2</sub> O hasta 500 ml
Solución B	NaOH 0.2 N SDS 1%	0.5 ml NaOH 10 M 2.5 ml SDS 20% H <sub>2</sub> O hasta 50 ml
Solución C	3 M acetato potásico 2 M ácido acético glacial	443 ml acetato potásico 3.4 M 57 ml ácido acético glacial 17.5 M
TE 1X	10 mM Tris-Cl pH 7.5 1 mM EDTA	5 ml Tris-Cl pH 7.5 1 M 1 ml EDTA 0.5 M H <sub>2</sub> O hasta 500 ml

#### **2.2.4. Purificación del plásmido mediante bromuro de etidio en un gradiente de cloruro de cesio**

En un tubo OptiSeal (Beckman Coulter, Brea, CA) de ultracentrífuga se introdujeron los 500 µl de plásmido obtenido en el paso anterior y se añadió una solución de cloruro de cesio

(CsCl) en TE a una concentración de 1.1 g CsCl/ml TE 1X hasta casi completar el tubo. Después, se añadieron 75  $\mu$ l de bromuro de etidio (BrEt; 10 mg/ml), un agente que se intercala entre las bases de ADN, y se continuó añadiendo CsCl hasta llenar el tubo por completo. Con una balanza de precisión, se calibraron los pesos de cada tubo para que los contrapesos fuesen exactos al centrifugar varias muestras, se sellaron y se colocaron en un rotor Type 70 Ti (Beckman Coulter). A continuación, las muestras se centrifugaron a 65000 rpm durante 15 h en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-100 XP (Beckman Coulter). Finalizada la centrifugación, en el tubo se observan dos bandas separadas de ADN cromosómico (superior) y plasmídico (inferior), como se muestra en la figura 20.



**Figura 20: Purificación del ADN plasmídico mediante marcaje con BrEt en un gradiente de CsCl.** En las imágenes se observa la separación de las bandas de ADN cromosómico y plasmídico tras la centrifugación. De esta manera, se puede recuperar el plásmido mediante punción del tubo y aspiración de la banda inferior.

Para aislar la banda de ADN plasmídico, se realizó en primer lugar un agujero en la parte superior del tubo con una aguja 20G para eliminar el vacío. A continuación, con una jeringa con una aguja 18G se pinchó inmediatamente debajo de la banda de ADN plasmídico y se aspiró hasta recuperarla por completo, sin llegar a tomar restos de ADN cromosómico.

Tras recuperar la banda de plásmido a un nuevo tubo de polipropileno de fondo redondo, comienza el proceso de eliminación del BrEt y del CsCl. En primer lugar, se eliminó el BrEt mediante lavados con butanol. Para ello se añadió a la muestra de ADN el mismo volumen de butanol y se agitó mediante inversión. Transcurridos unos minutos se forman 2 fases y el BrEt se desecha con la fase superior de butanol, que adquiere un tono rosado. Este procedimiento se

repitió 5 veces, hasta que la solución se hizo incolora, lo que indica que el BrEt ha sido eliminado de la muestra. A continuación, se realizó un proceso de diálisis para eliminar de la muestra de ADN el CsCl. En primer lugar, la membrana de diálisis se hidrató en agua bidestilada durante 20 min y se montaron con ellas los casetes de diálisis. Las muestras se pipetearon a dichos casetes, se cerraron herméticamente y éstos se introdujeron en un vaso de precipitados de 2 L con tampón de diálisis (1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, H<sub>2</sub>O). El proceso de diálisis se realizó a 4 °C con agitación magnética durante 3 h renovando el tampón de diálisis una vez transcurrida la mitad del tiempo. Al finalizar, las muestras se recogieron y se transfirieron a tubos nuevos.

Por último, para precipitar de nuevo el ADN se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100% y se dejaron a -20 °C durante la noche. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min a 4 °C y el ADN plasmídico obtenido se resuspendió en 100 µl de TE 1X para su cuantificación con *NanoDrop ND 1000* y posterior utilización.

### 2.3. Transfección de los plásmidos

La transfección de los vectores en las células endoteliales se realizó mediante electroporación, utilizando el aparato *Amaga Nucleofector* (Amaga, Gaithersburg, MD) junto con el kit de transfección de la misma casa comercial. La electroporación consiste en la aplicación de un campo eléctrico a una solución celular que provoca un aumento transitorio de la conductividad eléctrica y de la permeabilidad de la membrana. Cuando las células son electroporadas, se forman poros en su membrana durante milisegundos que permiten la incorporación del ADN presente en el medio que las rodea.

Se utilizaron células en un punto de confluencia aproximado del 70%. Una vez tripsinizadas, las células se lavaron con medio sin SBF (OptiMEM) para que los restos de éste no interfiriesen en el proceso de transfección. A continuación, las células endoteliales se resuspendieron en la solución comercial de transfección a razón de  $5 \times 10^5$  células por cada 100 µl de solución, cantidad que posteriormente es transferida a cada cubeta de transfección para el proceso de electroporación.

Junto con la solución de transfección en donde las células se encuentran resuspendidas, se añaden los plásmidos correspondientes. Para el silenciamiento de Nrf2 se utilizaron 4 construcciones diferentes de ARNhc insertadas en plásmidos distintos y se añadió 0.5  $\mu$ l de cada una por cada 100  $\mu$ l de solución, de manera que la cantidad total de plásmido en cada muestra fue de 5  $\mu$ g. En el caso de la sobreexpresión de Keap1, se utilizó un plásmido codificante para ADNc de Keap1 a una concentración de 2  $\mu$ l/cubeta (2.6  $\mu$ g totales). Por último, para asegurar que los efectos en las células endoteliales son debidos a la inhibición de la ruta de Nrf2 y no al proceso de transfección, se utilizó como control el mismo plásmido con una secuencia control (SC) aleatoria, no complementario a ningún transcrito conocido.

La cubeta se introdujo en el *Amaxa Nucleofector* (Figura 21) y se seleccionó el programa de electroporación configurado para las células endoteliales de arteria coronaria (S-005). Tras la electroporación, se añadieron inmediatamente a las células 500  $\mu$ l de medio con suero (MesoEndo) atemperado. A continuación, las muestras se transfirieron a nuevos frascos de cultivo o a las placas correspondientes en función de los experimentos a realizar.



**Figura 21: Sistema de electroporación Amaxa Nucleofector.** La transfección celular se realizó mediante electroporación. Las células endoteliales, inmersas en solución de transfección específica, se introducen en las cubetas revestidas de aluminio. El electroporador presenta un programa adecuado a distintos tipos celulares en cuanto a intensidad y tiempo de la descarga eléctrica.

Para comprobar la eficiencia de la transfección se utilizó un plásmido con el gen codificante para la proteína fluorescente verde. El número de células positivas para ésta (cuantificadas mediante citometría de flujo a las 24h de la transfección) reflejó una eficiencia de



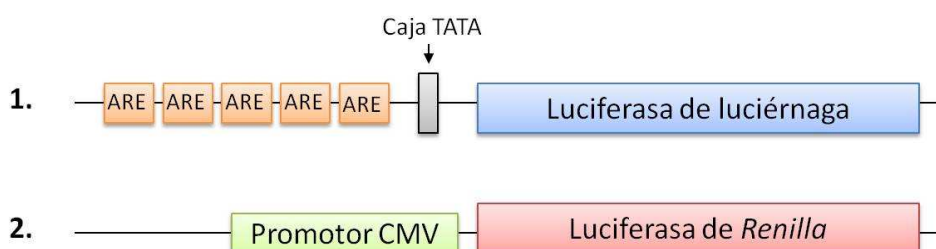
transfección de aproximadamente el 65% (es decir, aproximadamente el 65% de las células adquieren de manera efectiva el vector).

### 3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NRF2 MEDIANTE ENSAYO DE GEN REPORTERO

Cuando Nrf2 se activa, se trasloca al núcleo, en donde se une a la secuencia ARE para inducir la transcripción de genes antioxidantes y detoxificantes de fase II.

En este ensayo se transfectaron las células con una mezcla de 2 tipos de construcciones en proporción 40:1, respectivamente: una constituida por el gen reportero de la luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor basal (caja TATA) unido a repeticiones en tándem del elemento de respuesta transcripcional específico del experimento (secuencias ARE, en este caso: TCACAGTGACTCAGCAAAATT); y una segunda construcción de expresión constitutiva que codifica para el gen reportero de la luciferasa de *Renilla* bajo el control del promotor/potenciador del citomegalovirus (CMV), que ejerce de control interno para la normalización de la eficiencia de transfección y de la viabilidad celular (SA Biosciences, Frederick, MD).

Ambas luciferasas son buenos genes reporteros ya que catalizan reacciones luminiscentes, por lo que su cuantificación resulta fácil y eficaz. Además, no necesitan ningún procesamiento post-transcripcional para realizar su actividad enzimática, por lo que ejercen su función “reportera” inmediatamente después de su traducción.



**Figura 22: Representación esquemática de las construcciones usadas en el ensayo de gen reportero.** Las células endoteliales se transfectaron con una mezcla 40:1 de las construcciones 1 y 2, respectivamente. La construcción 1 consta de repeticiones en tándem de la secuencia de unión del factor de transcripción inducible Nrf2 (secuencia ARE) corriente arriba del gen de la luciferasa de luciérnaga. La construcción 2, utilizada para control interno, consta del promotor de transcripción temprana del CMV que provoca que la luciferasa de *Renilla* se exprese constitutivamente.

La transfección con la mezcla de ambos plásmidos (2 µg/cubeta) se realizó siguiendo el protocolo habitual utilizando el sistema de electroporación *Amaza Nucleofector*. Tras la transfección de la mezcla de las 2 construcciones, las células se sembraron en placas blancas de 96 pocillos de cultivo celular (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) aptas para ensayos de luminiscencia y se incubaron durante 24 h en medio completo. A continuación, las células se lavaron y se estimularon en medio Opti-MEM durante 3 h con los estímulos correspondientes. Transcurrido el tiempo de incubación con los estímulos, se eliminó el sobrenadante de los pocillos y se lavaron con PBS 1X. Después se lisaron las células añadiendo 50 µl de tampón de lisis (ver Tabla 5) a cada pocillo e incubando la placa durante 15 min en un agitador.

**Tabla 5: Composición del tampón de lisis celular.**

<b>Tampón de lisis celular (1X)</b>
25 mM Tris-fosfato (pH 7.8)
2 mM DTT
2 mM 1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-ácido tetraacético
10% glicerol
1% Triton X-100

Por último, la actividad de las luciferasas de luciérnaga y *Renilla* se determinó utilizando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay* (Promega) con un lector de placas Tecan Infinite M200 (Tecan, Research Triangle Park, NC). Los inyectores del lector de placas añadieron 50 µl del sustrato de la luciferasa de luciérnaga en cada pocillo y se registró la luminiscencia emitida durante 10 s. A continuación, el segundo inyector añadió 50 µl del segundo reactivo, que detiene la reacción de la luciferasa de luciérnaga al mismo tiempo que activa la reacción luminiscente de la luciferasa de *Renilla* al proporcionar su sustrato y, de nuevo, se registró la luminiscencia emitida por la segunda luciferasa en cada pocillo durante 10 s. La actividad transcripcional de Nrf2 en respuesta a los estímulos se cuantificó en función de la luminiscencia emitida por la luciferasa de luciérnaga, y normalizada frente a la luminiscencia de *Renilla*.

## 4. ENSAYOS DE ANGIOGÉNESIS

### 4.1. Valoración de la migración celular

La migración de las células endoteliales hacia el foco del estímulo angiogénico es uno de los primeros pasos en el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. Para valorar la capacidad de migración de las células endoteliales se realizó un ensayo de “cierre de herida” (*wound-healing*), que consiste en infligir una agresión en un punto del césped celular (similar a causar una herida) y monitorizar el tiempo necesario para que las células intactas de alrededor migren hasta la zona de la herida y la vuelvan a cubrir (similar al proceso de cierre o cicatrización de una herida). Se utilizó, para ello, el sistema de detección de impedancia eléctrica célula-sustrato o ECIS (*Electric Cell-substrate Impedance Sensing*) (Applied Biophysics, Troy, NY), que permite evaluar las propiedades morfológicas y funcionales de un sistema celular. Este sistema se basa en el crecimiento de células adherentes sobre un pocillo con microelectrodos de oro, que se emplean para realizar mediciones eléctricas. Se trata de una técnica no invasiva, ya que los voltajes utilizados para realizar las mediciones son muy bajos, por lo que los cambios registrados se deben atribuir tan sólo a factores externos al sistema de medición.

Para este ensayo se utilizaron placas chamber especiales de 8 pocillos (ECIS 8W1E) como la de la Figura 23. En cada pocillo existe un electrodo auxiliar o contraelectrodo, en el centro del cual se encuentra un pequeño electrodo activo de 250  $\mu\text{m}$  cuya superficie es de oro.



**Figura 23: Imagen de una placa ECIS 8W1E.** Las placas ECIS 8W1E (8 Wells, 1 Electrode) contienen 8 pocillos de aproximadamente 0.8 cm<sup>2</sup> que admiten un máximo de 500  $\mu\text{l}$ . Cada pocillo contiene un electrodo activo de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro recubierto con una película de oro y rodeado por un electrodo auxiliar. A su alrededor, el pocillo está recubierto de una película aislante. Cada electrodo de la placa está comunicado con la estación mediante conectores de oro en el extremo de la placa.

Las placas ECIS 8W1E se conectan a la fuente del sistema ECIS como se muestra en la Figura 24. Las células están sembradas formando una monocapa sobre el electrodo, de modo que la resistencia al paso de la corriente eléctrica es alta. Cuando se produce una lesión, por medio de una descarga eléctrica letal que elimina las células adheridas al electrodo activo, la resistencia al paso de la corriente se desploma. A medida que las células adyacentes al sitio de lesión migran para cubrir la zona vacía, la resistencia en el electrodo va aumentando.



**Figura 24: Componentes del sistema ECIS.** El sistema ECIS combina varios módulos para transmitir la corriente eléctrica de la fuente a las células presentes en cada pocillo de las placas. Dos placas ECIS 8W1E se insertan en una “estación de 16 pocillos” que puede introducirse a su vez en la estufa de cultivos para mantener a las células en el ambiente adecuado. La estación de 16 pocillos está conectada a la fuente, de manera que funciona como el transmisor de la corriente eléctrica entre las placas y la fuente. La fuente, a su vez, está conectada a un ordenador que monitoriza las variaciones en la resistencia eléctrica debido a cambios en el estado de las células. Mediante el software instalado se pueden seguir las medidas de impedancia, resistencia o capacitancia a tiempo real.

Para estudiar la capacidad de migración en las células endoteliales humanas de arteria coronaria en cultivo cuando presentan una disfunción del sistema Nrf2, se transfectaron en primer lugar las células siguiendo el protocolo habitual. A continuación, se sembraron en las placas ECIS 8W1E a razón de  $2.5 \times 10^5$  células/pocillo usando un volumen de 500  $\mu$ l de medio completo por pocillo y se colocaron en la estación de 16 pocillos en la estufa. Tras 24 h, cuando la inhibición de Nrf2 alcanza su punto máximo, el medio completo se cambió por medio sin suero y, tras 1 h de estabilización, se aplicó un campo eléctrico elevado de 5 mA durante 20 s a

60 kHz (herida), que causó la muerte y el desprendimiento de las células presentes en el electrodo activo. A continuación, las células se trataron con VEGF (100 ng/ml) y se continuó la monitorización durante 24 h (medidas cada 160 s a 4000 Hz). La tasa de migración, expresada como micrómetros por hora ( $\mu\text{m/h}$ ), se calculó a partir del tiempo que necesitaron las células de cada grupo experimental para alcanzar el 50% de la máxima confluencia (o, lo que es lo mismo, de la máxima resistencia). Para alcanzar la máxima confluencia, las células de alrededor de la circunferencia marcada por el electrodo activo tendrán que recorrer una distancia igual al radio de éste (125  $\mu\text{m}$ ). Por ello, el tiempo en alcanzar el 50% de la máxima confluencia es el tiempo necesario para recorrer 62.5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2. Ensayo de proliferación celular

La proliferación de las células endoteliales es un paso necesario en el proceso de angiogénesis para proporcionar células que formen el nuevo vaso. Para valorar la capacidad proliferativa de las células endoteliales en cultivo transfectadas con SC, ARNhc de Nrf2 o ADNc de Keap1 se utilizó el kit CellGrowth basado en citometría de flujo (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA).

En primer lugar, las células endoteliales de arteria coronaria humanas se tripsinizaron, se resuspendieron en Optim-MEM y se realizó el conteo. La cantidad deseada de células se resuspendió en una solución de PBS pH 7.4 + 0.1% de BSA de manera que la concentración final fuese de  $2.5 \times 10^7$  células/ml. A continuación, la suspensión celular se incubó con el fluoróforo CFDA-SE (*CarboxyFluorescein DiAcetate Succinimidyl Ester*) (16  $\mu\text{M}$ ) durante 15 min a 37 °C. El CFDA-SE difunde dentro de las células y es escindido por esterasas intracelulares para formar un producto amino-reactivo que emite una fluorescencia detectable y se une covalentemente a residuos intracelulares de lisina y otras fuentes de grupos amino. Este fluoróforo se divide equitativamente entre las células hijas, por lo que cuando una célula se divide, las células hijas presentan una concentración de CFDA-SE de aproximadamente el 50% de la célula original. De este modo, se observa una correlación inversa entre la intensidad de fluorescencia y la capacidad proliferativa de las células.

Tras la incubación, el fluoróforo no unido dentro de la célula, se inactivó con una incubación en medio completo (con al menos un 10% de SBF) durante 10 min a temperatura

ambiente. Después de 3 lavados con Opti-MEM (medio sin suero) se procedió a la transfección de las células con los vectores correspondientes. Tras la transfección, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad aproximada de  $2 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron durante 24 h con los factores angiogénicos VEGF o IGF-1.

Tras la incubación, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS pH 7.4 y se incubaron en PBS con 5  $\mu$ l de una solución de IP durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Este marcaje es necesario para poder excluir las células muertas del análisis, ya que sólo las células muertas son permeables al IP. Por último, la intensidad de fluorescencia de las células fue detectada mediante un citómetro de flujo (Guava EasyCyte; Millipore, Billerica, MA), usando el canal PM3 para detectar la fluorescencia verde del CFDA-SE y PM2 para la detección de la fluorescencia roja del IP. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia.

#### **4.3. Ensayos de adhesión celular**

Los ensayos de adhesión celular se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de poliestireno, de 96 pocillos, negras y de fondo plano transparente, aptas para medida de fluorescencia (Nunc). En primer lugar, los pocillos de dichas placas se revistieron con 50  $\mu$ l de soluciones de diferentes proteínas comunes en la composición de la matriz extracelular: vitronectina (1.6  $\mu$ g/ml), colágeno (50  $\mu$ g/ml) y laminina (50  $\mu$ g/ml). Como control negativo se recubrieron pocillos con BSA (12  $\mu$ g/ml). Las placas se incubaron en una estufa a 37 °C durante 1 h para asegurar un correcto revestimiento de los pocillos antes de realizar el experimento. A continuación, las células transfectadas 24 h atrás, se tripsinizaron, se lavaron en Opti-MEM y se sembraron en los pocillos revestidos a razón de  $10^4$  células/pocillo). Las células se estimularon y se incubaron en una estufa de cultivo celular a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 3 h para permitir la adhesión celular a las proteínas presentes en el revestimiento de los pocillos. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio junto con las células no adheridas se eliminó de los pocillos y éstos se lavaron cuidadosamente 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS atemperado. A continuación, se cuantificó el ratio de las células restantes adheridas a los pocillos incubándolas con el fluoróforo CyQuant (Invitrogen) durante 1 h a 37 °C. Cuando se une a los ácidos nucleicos, este compuesto exhibe una fuerte fluorescencia (excitación/emisión de 508/527, respectivamente), que fue

registrada en el lector de placas Tecan Infinite M200 y corregida con la fluorescencia de fondo. El valor de fluorescencia del control negativo con BSA se restó de cada condición experimental.

Como medida adicional de la capacidad de adhesión de las células endoteliales al colágeno, se utilizó de nuevo el sistema ECIS. Las células se sembraron en placas ECIS 8W1E, previamente revestidas con colágeno, a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/pocillo y se estimularon. En esta ocasión se monitorizaron los cambios en la capacitancia (a 60 kHz). La capacitancia es una medida de la capacidad del electrodo de almacenar la carga eléctrica. Así, cuando no hay células adheridas al electrodo activo, la capacitancia es del 100%. Sin embargo, a medida que las células se adhieren al electrodo, la corriente eléctrica fluye a través de ellas y se dispersa, lo que provoca la disminución progresiva de la capacitancia hasta llegar a su nivel mínimo cuando la adhesión es del 100%. Como medida de la capacidad de adhesión en los grupos experimentales, se valoró el tiempo necesario para alcanzar el 50% de la adhesión ( $t_{50}$ ), es decir, el tiempo transcurrido hasta que el 50% del electrodo estuvo cubierto.

#### **4.4. Ensayo de formación de tubos**

Una de las pruebas más sólidas para estudiar la formación de vasos tridimensionales es el conocido como ensayo de formación de tubos. Éste se basa en la capacidad de las células endoteliales de formar estructuras tridimensionales tubulares cuando se encuentran embebidas en una matriz. Para ello, las células endoteliales a estudio se sembraron en la matriz gelificada *Geltrex* (*Geltrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix*, Invitrogen), una matriz elaborada con componentes de la membrana basal.

En primer lugar, las células transfectadas 24 h atrás se tripsinizaron y se lavaron en medio Opti-MEM y se resuspendieron en medio 200PRF sin rojo fenol (Life Technologies) a una densidad de  $12.5 \times 10^4$  células/ml. A la suspensión de células se le añadieron en este momento los estímulos correspondientes.

Por otra parte, se preparó la placa en la que se cultivarán las células (placas de cultivo de 24 pocillos) con la matriz. En la placa de 24 pocillos se depositaron 150  $\mu$ l de la matriz *Geltrex* (descongelada durante la noche en un baño de hielo a 4 °C) en cada pocillo. Una vez preparados los pocillos, la placa se incubó durante 30 min a 37 °C para permitir que la matriz gelificase. Una

incubación de la matriz de más de 30 min provocaría que las células creciesen en monocapa en mayor medida que en estructuras tridimensionales.

Inmediatamente después de la incubación, 400  $\mu$ l de la suspensión celular ( $5 \times 10^4$  células) se añadieron cuidadosamente a cada pocillo, en contacto con la matriz recién gelificada. La placa se incubó toda la noche en una estufa de cultivo a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurridas 24 h de incubación, se tomaron imágenes de cada pocillo usando un microscopio Nikon Eclipse Ti equipado con un objetivo de contraste de fases de 10X. El nivel de formación de tubos en cada condición se cuantificó midiendo la longitud total de tubo formado en las imágenes tomadas en cada uno de 5 campos aleatorios por pocillo usando el programa NIS-Elements (Nikon Instruments Inc.). La media de la longitud total de tubos por área de la imagen ( $\mu\text{m}^2$  tubo/  $\text{mm}^2$ ) fue calculada para cada pocillo.

## 5. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS-3/7

Para determinar cambios en la viabilidad celular o en la sensibilidad a agentes inductores de apoptosis en células endoteliales, se evaluó la actividad de las caspasas efectoras caspasa-3 y caspasa-7 usando el kit comercial luminiscente Caspase-Glo 3/7 (Promega, Madison, WI).

En primer lugar, las células fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes e inmediatamente sembradas en placas de 96 pocillos blancas y de fondo plano transparente (Nunc), adecuadas para medidas de luminiscencia. Las células se sembraron a una densidad aproximada de  $2 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron durante 18 h en presencia de los estímulos proapoptóticos mostrados en la tabla 5.

**Tabla 6: Estímulos apoptóticos utilizados para medir actividad de caspasas 3/7.**

ESTÍMULO PROAPOPTÓTICO	CONCENTRACIÓN
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3 $\mu$ M 10 $\mu$ M
Glucosa	30 mM
LDLox (lipoproteína de baja densidad oxidada)	5 $\mu$ g/ml

A continuación, se añadió en cada pocillo el mismo volumen del reactivo Caspase-Glo 3/7 que de muestra y se agitó durante 30 s a 300 rpm. Este reactivo tiene la capacidad de lisar



las células y además contiene el sustrato DEVD-aminoluciferina junto con la enzima termoestable luciferasa. Las caspasas activadas en las muestras reconocen la secuencia aminoácida DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), donde realizan el corte proteolítico, liberándose así el sustrato luminógeno aminoluciferina. Cuando la luciferasa reacciona con la aminoluciferina, se genera una señal luminiscente directamente proporcional a la actividad de las caspasas 3/7. El pico de señal luminiscente se alcanza tras una incubación de aproximadamente 45 min a temperatura ambiente, momento en el que se utilizó un lector de placas de luminiscencia Tecan Infinite M200 para determinar la intensidad de la señal del pico de luminiscencia.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad PRISM versión 5 (GraphPad Software, San Diego, CA), realizándose análisis para muestras independientes. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó usando el test de Mann-Whitney o ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc Kruskal-Wallis, en función del tipo de experimento. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0.05$ . Los datos se expresaron como las medias  $\pm$  EEM.



## RESULTADOS



## **A. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre el proceso inflamatorio del sinoviocito humano en cultivo**

En este bloque se ha estudiado el efecto de una disfunción en la actividad mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria del sinoviocito humano. Para ello, se ha evaluado su efecto en la producción de ROS; su efecto en la expresión de mediadores inflamatorios y en la sensibilización del sinoviocito a la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas; y también su efecto en la inducción de angiogénesis. Además, se han analizado las posibles rutas involucradas en el proceso así como el papel modulador del RSV.

### **1. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SOBRE LA RESPUESTA OXIDATIVA E INFLAMATORIA EN EL SINOVIOCITO HUMANO NORMAL EN CULTIVO**

Para evaluar los efectos de una disfunción mitocondrial, se indujo una deficiencia en la mitocondria del sinoviocito mediante exposición a OLI, un inhibidor químico que interacciona con la subunidad delta u OSCP de la ATP sintasa. De esta manera, se impide el flujo de  $H^+$  de regreso a la matriz mitocondrial y con ello, la síntesis de ATP. El transporte electrónico en la CRM y la síntesis de ATP son dos procesos acoplados, uno no tiene lugar sin el otro (salvo excepciones como los procesos de termogénesis), y por tanto la inhibición de la ATP sintasa lleva consigo el bloqueo del transporte electrónico, provocando en última instancia el colapso de la mitocondria.

En este apartado se comprobó en primer lugar la eficacia de OLI para inducir disfunción mitocondrial y provocar una respuesta oxidativa y, a continuación, se valoró su efecto en la respuesta inflamatoria de las células sinoviales.

#### **1.1. Valoración de la eficacia de OLI para la inducción de disfunción mitocondrial**

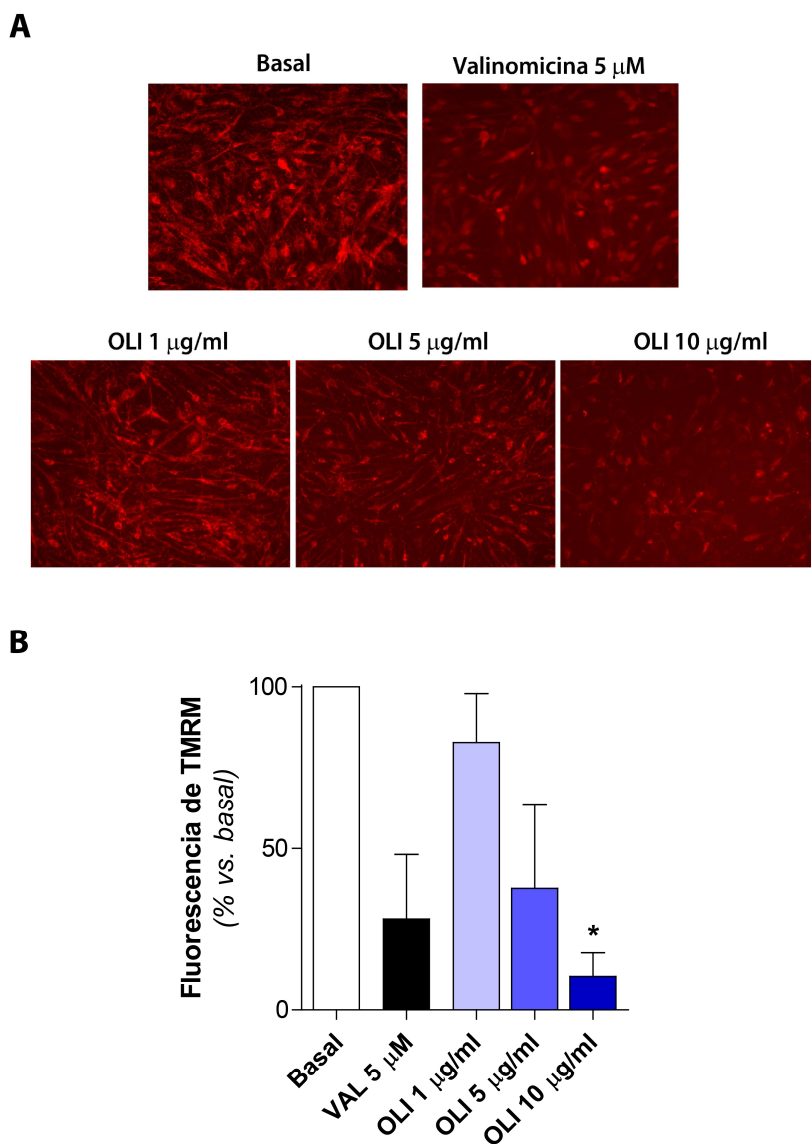
Para evaluar la eficacia de la disfunción mitocondrial inducida por OLI en sinoviocitos humanos en cultivo se emplearon dos aproximaciones: determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y producción de ATP.

### 1.1.1. Efecto de OLI sobre el potencial de membrana mitocondrial

El  $\Delta\Psi_m$  constituye un parámetro fisiológico mitocondrial de gran importancia, ya que se relaciona con la capacidad de la mitocondria para generar ATP mediante la fosforilación oxidativa. Además, también regula la producción de ROS, convirtiéndose por tanto en un controlador clave del buen funcionamiento celular.

Para determinar el efecto de la disfunción mitocondrial en el  $\Delta\Psi_m$ , las células se trataron con OLI durante 9 h. Durante los últimos 30 min de tratamiento se añadió la sonda fluorescente tetrametilrodamina metil éster (TMRM) a una concentración final de 20 nM. Las células se observaron en un microscopio invertido directamente en la placa de cultivo, sin lavar las células ni cambiar el medio para evitar posibles artefactos que confundan los resultados.

El tratamiento de los sinoviocitos humanos con el inhibidor de la ATP sintasa indujo una despolarización de la membrana mitocondrial de manera dosis-dependiente, como se puede apreciar en la Figura 25. El control positivo de despolarización mitocondrial, valinomicina (5  $\mu$ M), indujo una disminución de la fluorescencia de aproximadamente un 72% respecto a la condición basal. La dosis de OLI 10  $\mu$ g/ml, por su parte, superó el efecto de la valinomicina, al producir una disminución de la fluorescencia de TMRM de un 90%.

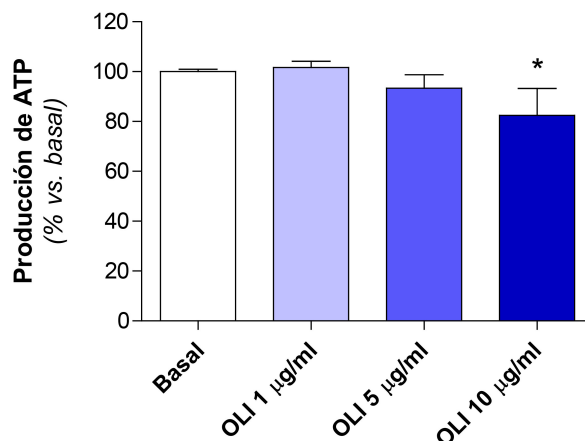


**Figura 25. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en respuesta a la exposición a OLI.** La determinación del  $\Delta\Psi_m$  en sinoviocitos humanos en cultivo expuestos o no a dosis crecientes de OLI durante 9 h se determinó mediante incubación de 30 min con la sonda fluorescente TMRM (20 nM). Valinomicina (VAL) es un control positivo de despolarización mitocondrial. **A.** Las imágenes fueron tomadas en un microscopio invertido de fluorescencia a una magnificación de 10X. Son representativas de n=4 experimentos. **B.** Cuantificación de la fluorescencia emitida por cada condición experimental respecto al basal. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de la intensidad de fluorescencia (n=4). \*  $P \leq 0.05$  vs. basal.

### 1.1.2. Efecto de OLI sobre la producción de ATP

Bajos niveles de producción de ATP pueden ser indicadores de disfunción mitocondrial. En este estudio se determinaron los niveles de ATP total producidos por sinoviocitos estimulados

durante 24 h con dosis crecientes de OLI. La Figura 26 muestra los niveles de ATP respecto a la condición basal, medidos mediante luminiscencia. Como se puede observar, OLI indujo una disminución de los niveles de ATP de hasta un 18% (OLI 10  $\mu\text{g/ml}$ ).



**Figura 26. Determinación de la producción de ATP en respuesta a OLI.** La producción de ATP celular total se determinó mediante luminiscencia en sinoviocitos tratados con distintas dosis de OLI durante 24 h. La concentración de ATP ( $\mu\text{M}$ ) se determinó a partir de una curva patrón de ATP. Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de la concentración de ATP respecto a la condición basal ( $n=3$  experimentos por triplicado). \* $P \leq 0.05$  vs. basal.

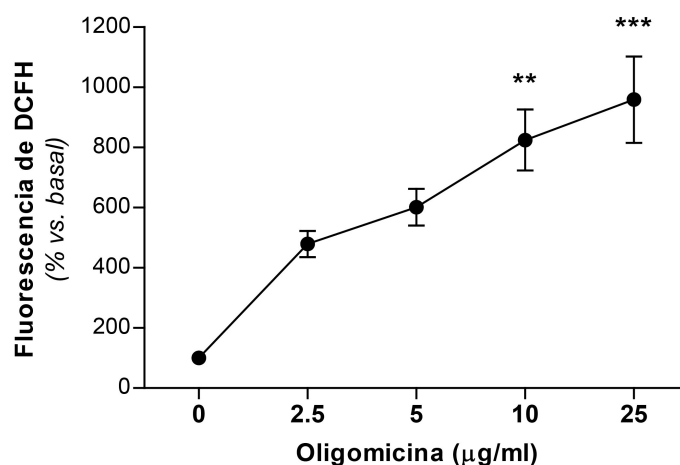
## 1.2. Efecto de la disfunción mitocondrial en la producción de especies reactivas de oxígeno

El efecto de la inhibición de la ATP sintasa en la producción de ROS por los sinoviocitos normales en cultivo se evaluó mediante la medida de  $\text{H}_2\text{O}_2$  celular total, y la medida de  $\text{O}_2^-$  celular y mitocondrial.

### 1.2.1. Cuantificación de la producción de peróxido de hidrógeno celular total

La producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se cuantificó en células estimuladas con OLI durante 15 min, previa incubación con el fluoróforo DCFH-DA durante 30 min. Cuando las células se analizaron por citometría de flujo se observó que OLI indujo un desplazamiento de la población, aumentando la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) de manera dosis-dependiente. Así, OLI 10  $\mu\text{g/ml}$  indujo un aumento de hasta 8 veces en la intensidad de fluorescencia respecto al basal (Figura 27).

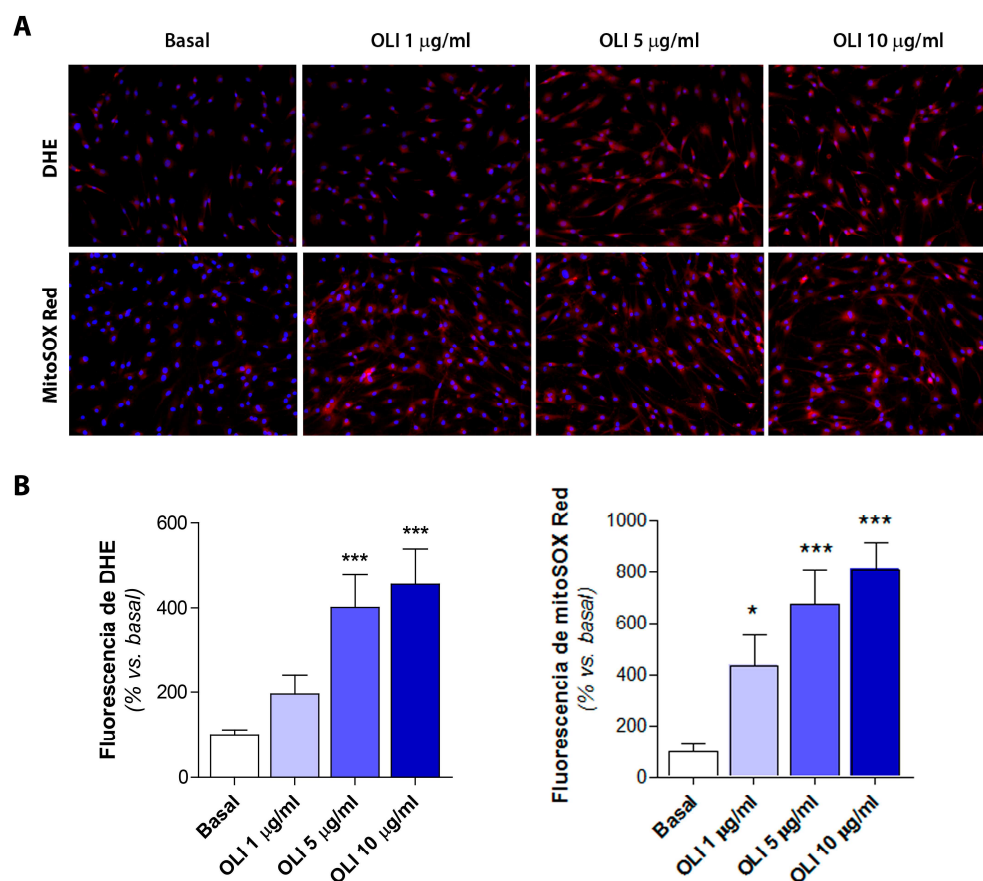




**Figura 27. Producción de  $H_2O_2$  en sinoviocitos humanos estimulados con una curva de dosis de OLI.** La producción de ROS en los sinoviocitos humanos se cuantificó tras 15 min de incubación con dosis crecientes de OLI. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de intensidad de fluorescencia del DCFH relativo al control (n=3 experimentos independientes por duplicado; \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  vs. control).

### 1.2.2. Detección de superóxido intracelular y mitocondrial

La detección de  $O_2^-$  intracelular y mitocondrial se llevó a cabo mediante la incubación durante 30 min con los fluoróforos DHE y mitoSOX red, respectivamente, y posterior detección mediante microscopía de fluorescencia. Durante el tiempo de incubación con los fluoróforos, las células se trataron con o sin OLI. Como se observa en la Figura 28, el tratamiento con OLI indujo un incremento dosis-dependiente en la producción de  $O_2^-$  tanto intracelular como mitocondrial.



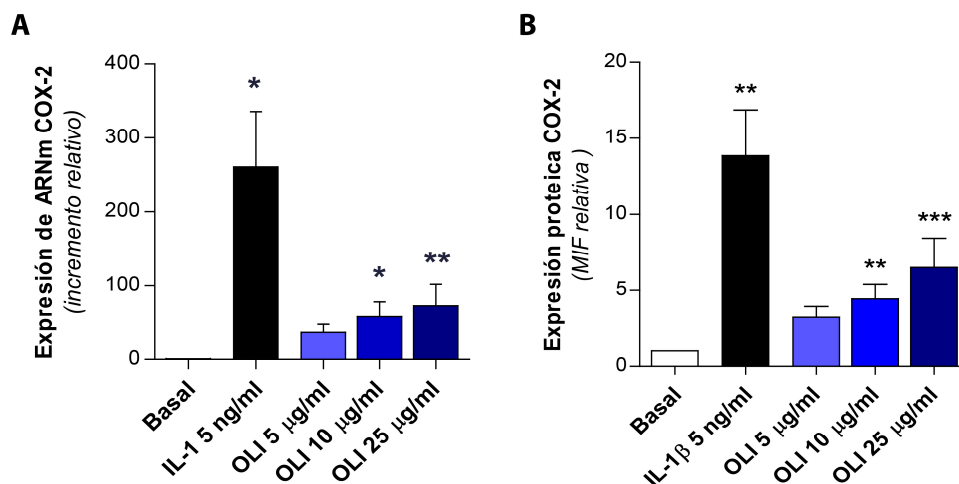
**Figura 28. Determinación de la producción de superóxido total y mitocondrial en respuesta a la exposición a OLI.** La evaluación de la producción de ROS en sinoviocitos humanos en cultivo expuestos o no a dosis crecientes de OLI durante 30 min se determinó mediante coincubación de OLI con los fluoróforos DHE (detección de  $\text{O}_2^-$  celular) o mitoSOX red (detección de  $\text{O}_2^-$  mitocondrial) durante 30 min. **A.** Se muestran imágenes representativas de cada condición evaluada. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia emitida respecto al basal de cada condición experimental en presencia de DHE (izquierda,  $n=5$ ) o de mitoSOX (derecha,  $n=4$ ). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de la intensidad de fluorescencia respecto a la condición basal ( $n=5$ ; \* $P \leq 0.05$  vs. basal).

### 1.3. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de mediadores inflamatorios

El efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria de los sinoviocitos se evaluó mediante la cuantificación de algunos de los mediadores inflamatorios más comunes y relevantes en el proceso artrítico: COX-2,  $\text{PGE}_2$ , e IL-8.

### 1.3.1. Expresión de COX-2

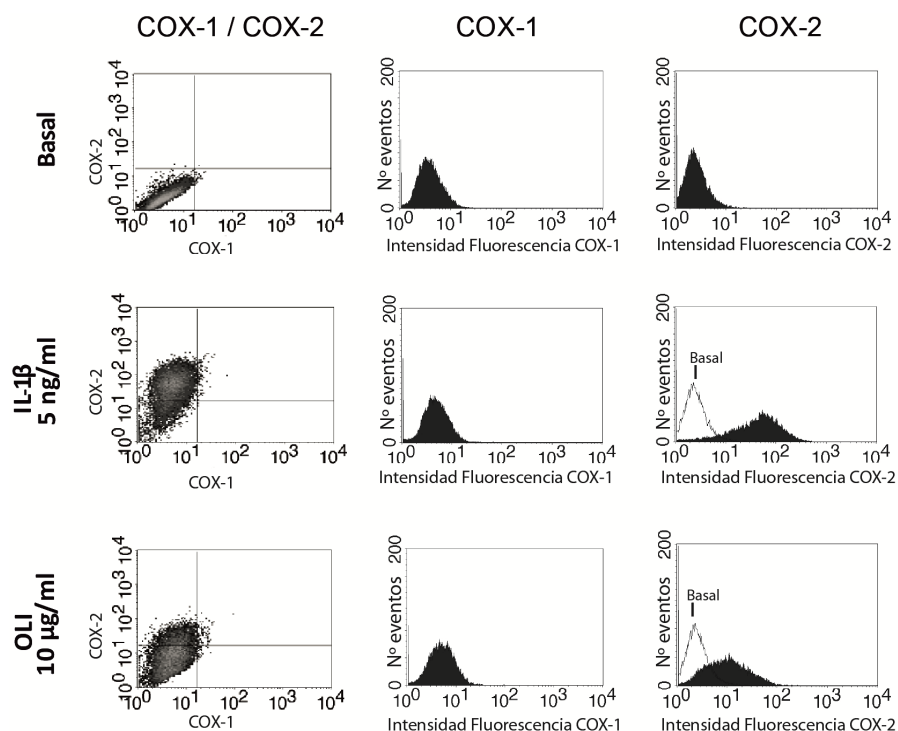
En primer lugar, se evaluó la expresión de ARNm de COX-2 en sinoviocitos incubados durante 4 h con dosis crecientes de OLI. Como se observa en la Figura 29A, OLI provocó un incremento de la expresión de ARNm de COX-2 de manera dosis-dependiente. De forma similar, OLI indujo un aumento dosis-dependiente en los niveles proteicos de COX-2 tras 6 h de estimulación, determinados mediante citometría de flujo (Figura 29B).



**Figura 29. Expresión de COX-2 inducida por disfunción mitocondrial en sinoviocitos humanos normales.**

**A.** La expresión de ARNm de COX-2 se cuantificó tras 4 h de estimulación con IL-1 $\beta$  5 ng/ml (control positivo) o con dosis crecientes de OLI. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 1 (n=5; \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$  vs. basal). **B.** La expresión proteica de COX-2 se cuantificó tras 6 h de estimulación con IL-1 $\beta$  5 ng/ml (control positivo) o con dosis crecientes de OLI. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) relativo a la condición basal normalizada a 1 (n=9; \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  vs. basal).

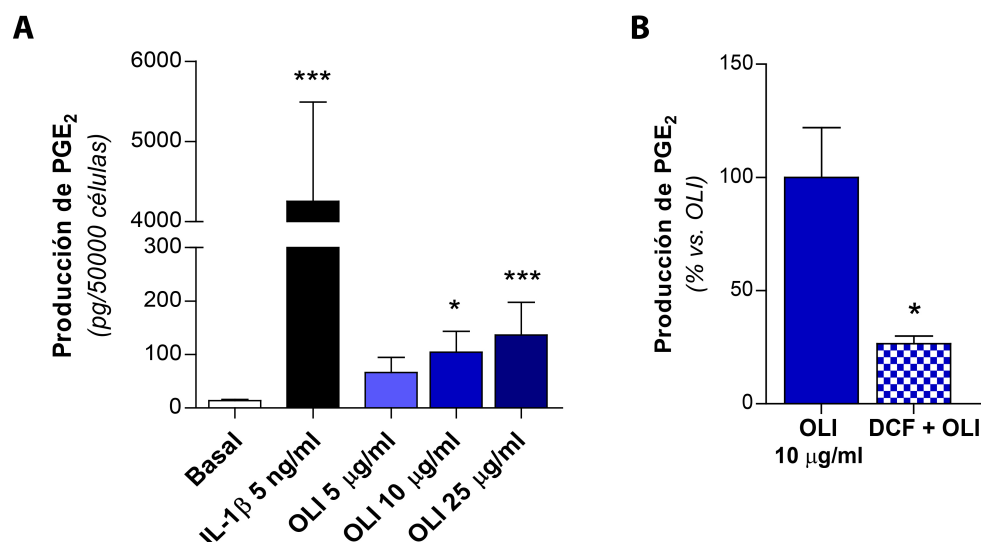
Como se esperaba, OLI no modificó la expresión de COX-1, la isoforma constitutiva de la enzima (Figura 30).



**Figura 30. Comparación entre la modulación de COX-1 y COX-2 en respuesta a OLI en sinoviocitos.** Experimento representativo de citometría de flujo para la cuantificación de la expresión proteica de COX-1 y COX-2 bajo condiciones basales (arriba), estimulación con IL-1 $\beta$  5 ng/ml (centro) como control positivo, o estimulación con OLI 10  $\mu$ g/ml (abajo), durante 6 h. La columna de la izquierda muestra los densitogramas de las poblaciones celulares en función de la intensidad de fluorescencia registrada de COX-1 frente a COX-2. En los histogramas se representa el número de células (*counts*) respecto a la intensidad de fluorescencia de COX-1 (centro) o COX-2 (derecha) para cada condición.

### 1.3.2. Producción de PGE<sub>2</sub>

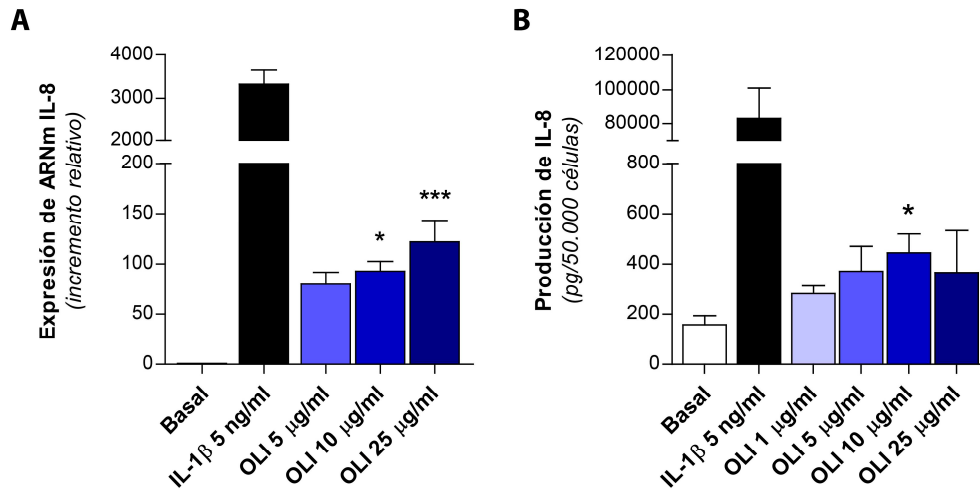
Ya que PGE<sub>2</sub> es el principal producto inflamatorio que resulta de la actividad enzimática de COX-2, se midieron los niveles de esta prostaglandina mediante ELISA en los sobrenadantes de sinoviocitos estimulados durante 9 h con dosis crecientes de OLI. Como se puede observar en la Figura 31, la disfunción mitocondrial inducida por OLI ocasionó un pronunciado incremento en la liberación de PGE<sub>2</sub> al medio. Esta liberación fue fuertemente contrarrestada mediante la preincubación durante 1 h con el inhibidor de la COX-2, diclofenaco, lo que demuestra la implicación de esta enzima en el aumento de la producción de PGE<sub>2</sub> inducido por la disfunción mitocondrial.



**Figura 31. Producción de PGE<sub>2</sub> en sinoviocitos humanos normales estimulados con OLI.** **A.** La producción de PGE<sub>2</sub> se evaluó en sobrenadantes de sinoviocitos humanos expuestos durante 9 h a IL-1β 5 ng/ml (control positivo) o a dosis crecientes de OLI. Los resultados se expresan como la media ± EEM de la cantidad (en pg) de PGE<sub>2</sub> liberada por 50.000 células (n=5 en duplicado; \* $P \leq 0.05$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  vs. basal). **B.** Se determinó la producción de PGE<sub>2</sub> inducida por OLI sola o en presencia de diclofenaco (DCF) 10 μM (1 h de preincubación) tras 9 h. Los resultados se expresan como media ± EEM del porcentaje de producción de PGE<sub>2</sub> respecto a OLI sola (n=5; \* $P \leq 0.05$  vs. OLI).

### 1.3.3. Expresión de IL-8

IL-8 es una quimioquina que juega un papel determinante en la atracción de células inmunes durante el proceso de inflamación, por lo que su estudio resulta de gran importancia. Como se muestra en la Figura 32A, el tratamiento con OLI durante 4 h indujo un aumento dosis-dependiente de la expresión de ARNm de IL-8 respecto al basal. Además, como era de esperar, se obtuvieron resultados similares cuando se determinaron los niveles proteicos mediante ELISA (Figura 32B).



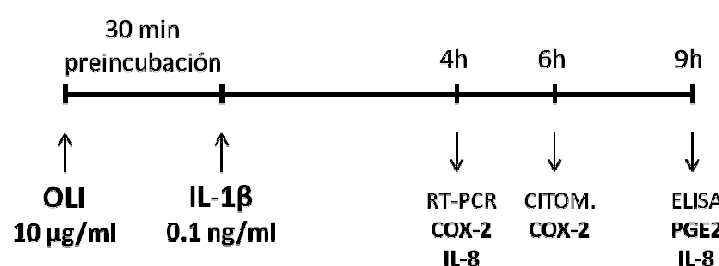
**Figura 32. Expresión de ARNm y proteína de IL-8 en sinoviocitos humanos expuestos a OLI.** **A.** La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 4 h de estimulación con IL-1β 5 ng/ml (control positivo) o con dosis crecientes de OLI. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 1 ( $n=6$ ; \* $P \leq 0.05$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  vs. basal). **B.** La producción de IL-8 se evaluó en sobrenadantes de sinoviocitos humanos expuestos durante 9 h a IL-1β 5 ng/ml o a dosis crecientes de OLI. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de la cantidad (en pg) de IL-8 liberada por  $5 \times 10^4$  células ( $n=4$ ; \* $P \leq 0.05$  vs. basal).

En conjunto, los resultados de este primer apartado demuestran la efectividad de OLI para inducir disfunción mitocondrial al provocar una despolarización de la mitocondria y una disminución en la producción de ATP. Además, la disfunción de la actividad mitocondrial produce un aumento en la generación de ROS tanto mitocondriales como citoplasmáticos y una respuesta inflamatoria en los sinoviocitos humanos, en términos de producción de COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8.

## 2. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR INTERLEUQUINA-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) EN SINOVIOCITOS HUMANOS NORMALES EN CULTIVO

La presencia de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 $\beta$ , induce en el sinoviocito una activación del estado inflamatorio. Como se ha observado en el anterior apartado, la disfunción mitocondrial induce también una leve respuesta inflamatoria. En la articulación, los sinoviocitos AR, que presentan alteraciones mitocondriales, están sometidos a un ambiente proinflamatorio, debido a la presencia de múltiples mediadores, siendo uno de los más importantes la citoquina IL-1 $\beta$ . Por ello, el segundo objetivo de este bloque fue estudiar el efecto conjunto de la disfunción mitocondrial (preincubación con OLI 10  $\mu$ g/ml) y la presencia de IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml) en relación con la expresión de los mediadores inflamatorios COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8.

El esquema del procedimiento experimental común para estos estudios se muestra en la Figura 33:



**Figura 33: Esquema experimental para estudiar la expresión de mediadores inflamatorios inducida por IL-1 $\beta$  en células con disfunción mitocondrial.** Para realizar este abordaje se indujo la disfunción mitocondrial incubando los sinoviocitos con OLI durante 30 min. A continuación, se añadió IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml y se incubaron las células durante diferentes tiempos, en función de la determinación a realizar: 4 h para los estudios de expresión génica de COX-2 e IL-8 mediante RT-PCR; 6 h para la determinación proteica de COX-2 mediante citometría de flujo; y 9 h para la determinación de PGE<sub>2</sub> e IL-8 mediante ELISA.

### 2.1. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 $\beta$

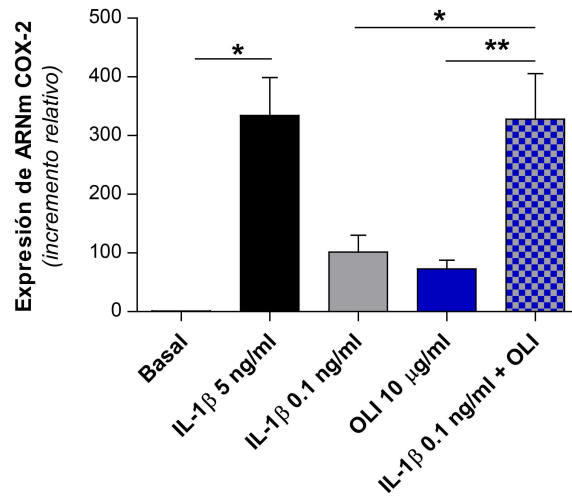
Para estudiar la expresión de COX-2 bajo condiciones de disfunción mitocondrial en un ambiente proinflamatorio, en primer lugar se preincubaron las células durante 30 min con OLI 10  $\mu$ g/ml provocando la disfunción mitocondrial. A continuación, se añadió IL-1 $\beta$  (0.1 ng/ml) y se dejó desarrollar la respuesta inflamatoria.

Para el estudio de la expresión génica de COX-2 se recogió el ARN transcurridas 4 h de estimulación. Como se puede observar en la Figura 34A, OLI indujo, por sí sola, un aumento de expresión de ARNm de COX-2 de  $72.72 \pm 14.84$  veces respecto al basal, e IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml de  $101.7 \pm 28.68$  veces. En la condición de la combinación de IL-1 $\beta$  + OLI, se incrementó la expresión hasta  $328.1 \pm 77.62$  veces respecto al basal, lo que supone un efecto sinérgico de ambos estímulos en la inducción de la expresión de COX-2. Este incremento sinérgico alcanza los niveles de expresión de COX-2 inducidos por el control positivo IL-1 $\beta$  5 ng/ml.

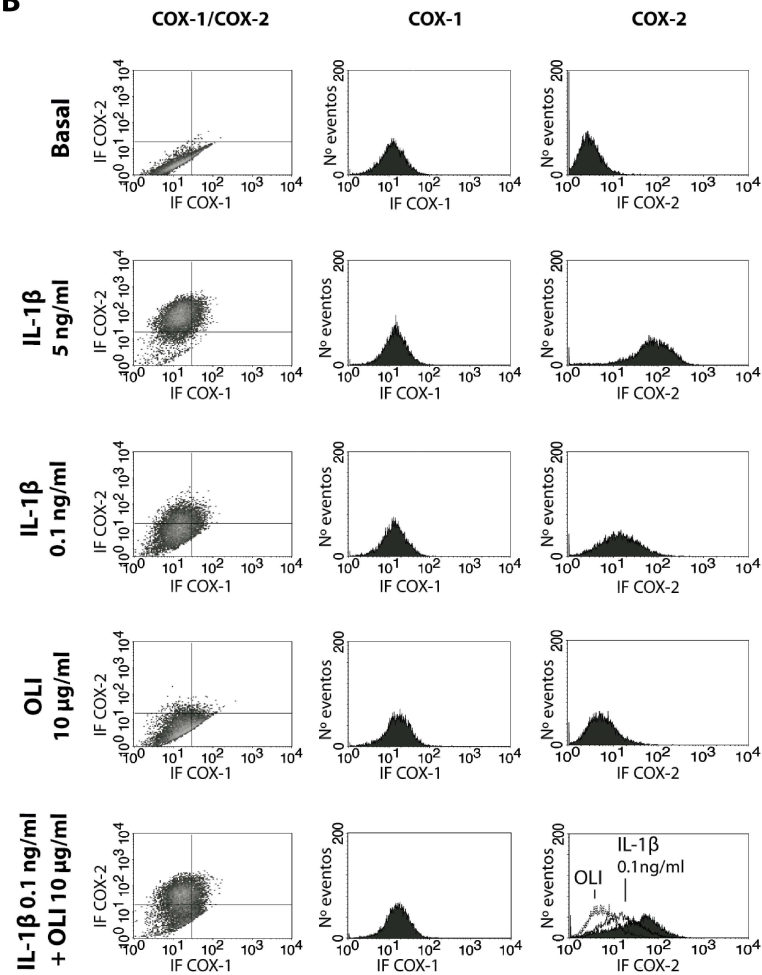
A nivel proteico se encontraron respuestas similares. Tras una preincubación de 30 min con OLI seguida de 6 h de estimulación con IL-1 $\beta$ , se recogieron las células y se incubaron, como se describió en la sección de *Métodos*, con anti-COX-1/anti-COX-2 para ser analizadas mediante citometría de flujo. Así, se observó que OLI actúa de forma sinérgica con IL-1 $\beta$  induciendo la expresión proteica de COX-2 (Figura 34B): MIF de COX-2 de  $13.93 \pm 3.57$  en la condición IL-1 $\beta$  + OLI, frente a  $3.80 \pm 0.60$  en OLI y  $3.55 \pm 0.49$  en IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml,  $n = 7$ ,  $P \leq 0.05$ ). Nuevamente, se confirmó que la isoforma constitutiva COX-1 no se modula en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 34B).



**A**

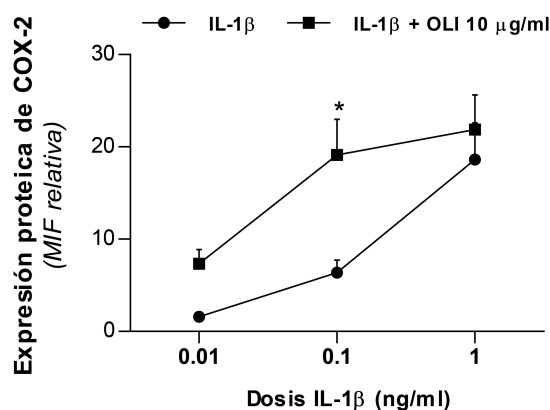


**B**



**Figura 34. Expresión génica y proteica de COX-2 en sinoviocitos humanos tratados con la combinación IL-1 $\beta$  + OLI.** **A.** La expresión de ARNm de COX-2 se cuantificó en sinoviocitos tratados durante 4 h bajo condiciones basales, o con IL-1 $\beta$  5 ng/ml (control positivo), IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml, OLI 10  $\mu$ g/ml sola o con el pretratamiento de OLI seguido de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml (IL-1 $\beta$  + OLI). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 1 (n=6; \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ ). **B.** Se muestra un experimento representativo de citometría de flujo mostrando la expresión proteica de COX-1 y COX-2 en células sinoviales humanas tratadas con los estímulos indicados durante 6 horas. Los densitogramas (izquierda) muestran la distribución de la población celular en cuanto a positividad frente a COX-1 (abscisas) y COX-2 (ordenadas). En los histogramas se observa la distribución de la población en cuanto a intensidad de fluorescencia (IF) para COX-1 (centro) o para COX-2 (derecha). En el histograma de COX-2 de la condición IL-1 $\beta$  0.1 mg/ml + OLI 10  $\mu$ g/ml se muestran también los perfiles del histograma correspondiente a la condición de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml sola y de OLI sola.

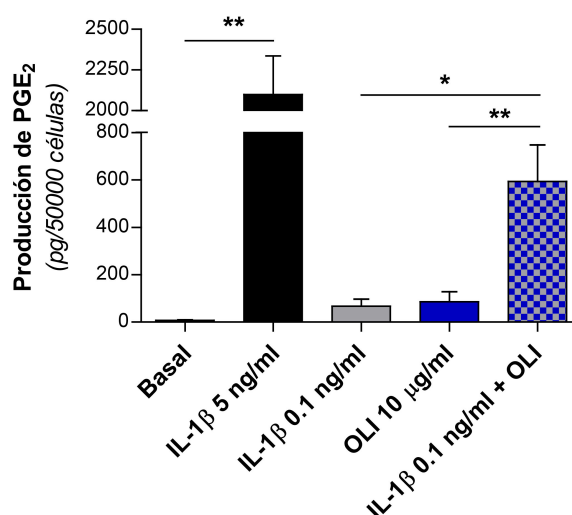
Por otra parte, es importante destacar que el efecto sinérgico descrito para la expresión proteica de COX-2 se produce con distintas dosis de IL-1 $\beta$ . Como se puede observar en la Figura 35, el pretratamiento con OLI es capaz de provocar prácticamente el mismo nivel de respuesta inflamatoria que una concentración 10 veces mayor de IL-1 $\beta$ . Además, el porcentaje de incremento sinérgico resultó ser mayor con la menor dosis de IL-1 $\beta$ . Así, el porcentaje de incremento de IL-1 $\beta$  1 ng/ml + OLI 10  $\mu$ g/ml respecto a IL-1 $\beta$  1 ng/ml sola es de un  $133.6 \pm 27.8\%$ ; el porcentaje de incremento de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml + OLI 10  $\mu$ g/ml respecto a IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml sola es de  $338.7 \pm 92.2\%$ ; y el máximo incremento se encuentra con IL-1 $\beta$  0.01 ng/ml + OLI 10  $\mu$ g/ml respecto a IL-1 $\beta$  0.01 ng/ml sola que es de un  $470.9 \pm 107.4\%$  (n=6).



**Figura 35. Curva de expresión proteica de COX-2 en sinoviocitos humanos sometidos a disfunción mitocondrial en presencia de distintas dosis de IL-1 $\beta$ .** La expresión proteica de COX-2 se cuantificó a las 6 h en sinoviocitos expuestos a dosis crecientes de IL-1 $\beta$  (1, 0.1, 0.01 ng/ml) sola (línea con círculos) o en sinoviocitos pretratados con OLI 10  $\mu$ g/ml antes de la incubación con las dosis crecientes de IL-1 $\beta$  (línea con cuadrados). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de la MIF relativa a la condición basal (n=6; \* $P \leq 0.05$  vs. IL-1 $\beta$  0.1).

## 2.2. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la liberación de PGE<sub>2</sub> inducida por IL-1 $\beta$

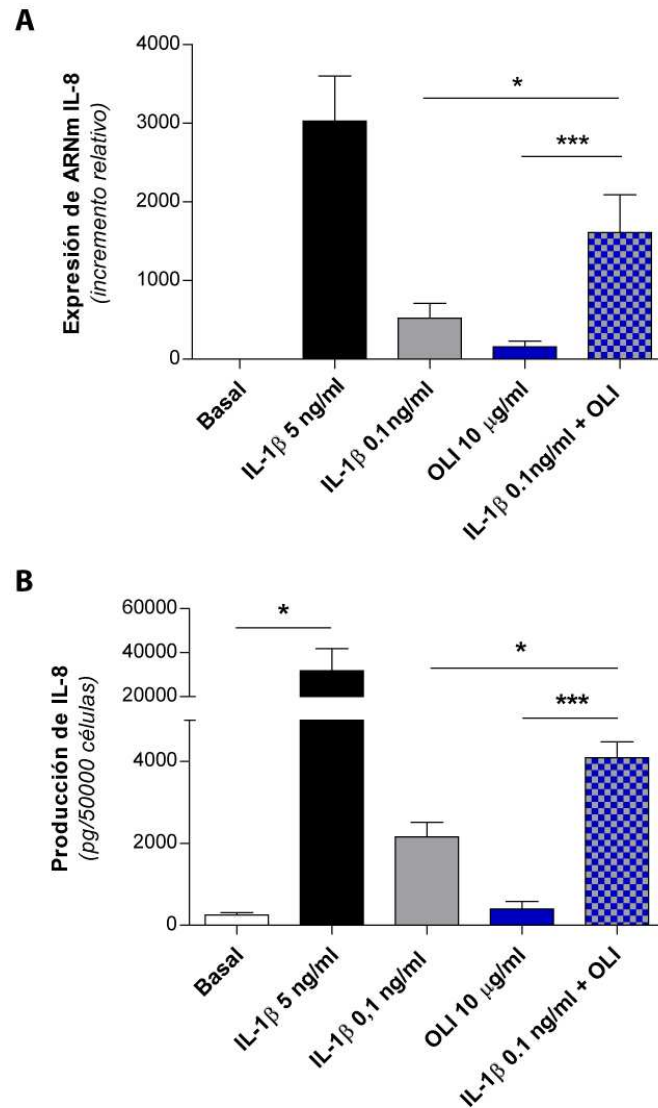
En cuanto a la producción de PGE<sub>2</sub>, el principal producto de la enzima COX-2, la combinación de la disfunción mitocondrial y la presencia de IL-1 $\beta$ , indujo resultados acordes con los anteriores. Los sinoviocitos se preincubaron durante 30 min con OLI 10  $\mu$ g/ml antes de añadir IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml durante 9 h. La cantidad de PGE<sub>2</sub> liberada al medio de cultivo se cuantificó mediante ELISA. Como se observa en la Figura 36, los resultados demostraron que se induce una producción sinérgica de PGE<sub>2</sub> cuando las células se incuban con IL-1 $\beta$  + OLI (593.6  $\pm$  153.9 pg PGE<sub>2</sub>/pocillo) frente a IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml sola (66.59  $\pm$  30.32 pg/pocillo) y OLI sola (86.30  $\pm$  41.93 pg/pocillo).



**Figura 36. Producción de PGE<sub>2</sub> en sinoviocitos humanos tratados con IL-1 $\beta$  + OLI.** La liberación de PGE<sub>2</sub> se cuantificó tras 9 h bajo condiciones basales, o bajo estimulación con IL-1 $\beta$  5 ng/ml (control positivo), con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml, con OLI o con el pretratamiento con OLI seguido de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml (IL-1 $\beta$  + OLI). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de la cantidad de PGE<sub>2</sub> (en pg) liberada por  $5 \times 10^4$  células (n=7; \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ ).

## 2.3. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1 $\beta$

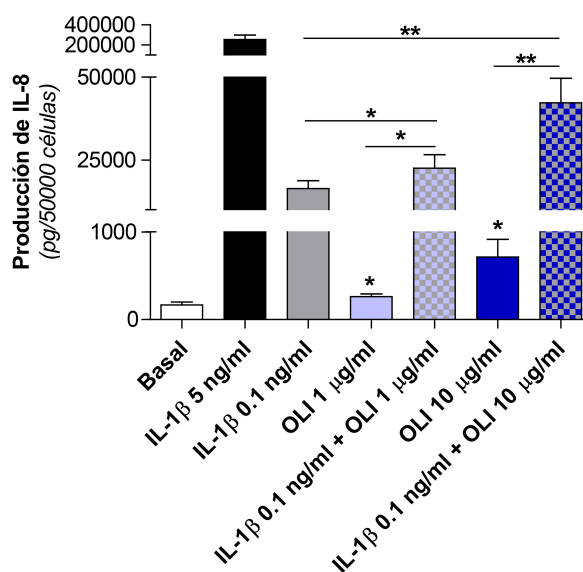
Como ya se ha descrito, la quimioquina IL-8 se expresa en grandes cantidades en sinoviocitos AR, participando de manera destacable en la patofisiología de la enfermedad. Cuando los sinoviocitos se sensibilizaron con OLI durante 30 min, se produjo un incremento significativo de la expresión de IL-8 inducida por IL-1 $\beta$  tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico (Figura 37).



**Figura 37. Expresión de ARNm y proteína de IL-8 en sinoviocitos humanos estimulados con IL-1 $\beta$  + OLI.** **A.** La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 4 h bajo condiciones basales, o bajo estimulación con IL-1 $\beta$  5 ng/ml (control positivo), con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml, con OLI o con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml + OLI. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 1 ( $n=10$ ;  $*P\leq 0.05$ ,  $***P\leq 0.001$ ). **B.** La cantidad de IL-8 liberada al medio por los sinoviocitos humanos expuestos a los estímulos descritos arriba se determinó mediante ELISA tras 9 h de incubación. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de la cantidad de IL-8 (en pg) liberada por  $5\times 10^4$  células ( $n=4$  experimentos independientes por duplicado;  $*P\leq 0.05$ ,  $***P\leq 0.001$ ).

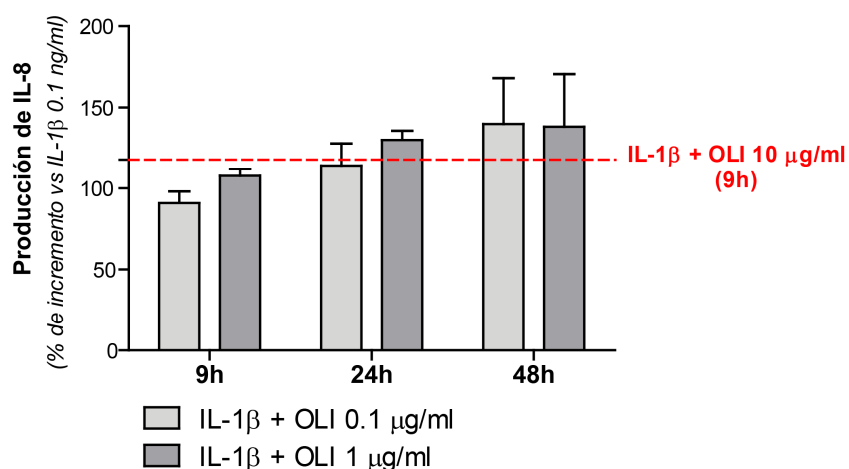
## 2.4. Influencia de la dosis de OLI sobre la inducción de la respuesta inflamatoria

La dosis de OLI es también una variable a tener en cuenta. El daño mitocondrial exacerbado puede ocasionar desequilibrios en la célula que afecten a rutas metabólicas distintas y que enmascaren nuestros resultados. Por ello, es importante determinar que daños mitocondriales más moderados inducen efectos similares respecto a la respuesta inflamatoria. Para ello, hemos comprobado que una dosis diez veces menor de OLI (1  $\mu\text{g/ml}$ ) es capaz de inducir también una respuesta inflamatoria en los sinoviocitos y que además interacciona de manera sinérgica con la IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml para producir IL-8. Como se puede observar en la Figura 38, OLI 1  $\mu\text{g/ml}$  produce un incremento significativo en la liberación de IL-8, aunque, como era de esperar, su efecto es de menor proporción que el observado con OLI 10  $\mu\text{g/ml}$ . Así, el porcentaje de incremento de IL-8 inducido por IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml + OLI 1  $\mu\text{g/ml}$  respecto a IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml sola es de un  $36.5 \pm 9.5\%$  mientras que el inducido por IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml + OLI 10  $\mu\text{g/ml}$  respecto a IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml sola es de un  $147.4 \pm 28.8\%$ .



**Figura 38.** Efecto de OLI 1  $\mu\text{g/ml}$ , en comparación con OLI 10  $\mu\text{g/ml}$ , en la respuesta inflamatoria de sinoviocitos humanos estimulados o no con IL-1 $\beta$ . Las células se trataron durante 9 h bajo las condiciones indicadas. OLI se añadió a las células 30 min antes de la adición de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml. La concentración de IL-8 se determinó en los sobrenadantes obtenidos mediante ELISA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de la cantidad (en pg) de IL-8 liberada por  $5 \times 10^4$  células ( $n=4$  experimentos independientes en duplicado; \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ ).

Asimismo, quisimos conocer si el efecto sinérgico descrito entre la disfunción mitocondrial e IL-1 $\beta$  se mantendría a tiempos más largos. OLI 10  $\mu\text{g/ml}$  es una dosis ampliamente utilizada en estudios de expresión génica y proteica a tiempos cortos (0 – 24 h). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados a tiempos superiores descritos en la literatura utilizan dosis menores de OLI. Por este motivo, los experimentos para comprobar la perpetuación en el tiempo de la respuesta inflamatoria se realizaron con dosis menores de OLI (1 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) a tiempos de 24 y 48 h. Como se muestra en la Figura 39, la exacerbación de la respuesta inflamatoria inducida por disfunción mitocondrial e IL-1 $\beta$  se mantiene a las 48 h.

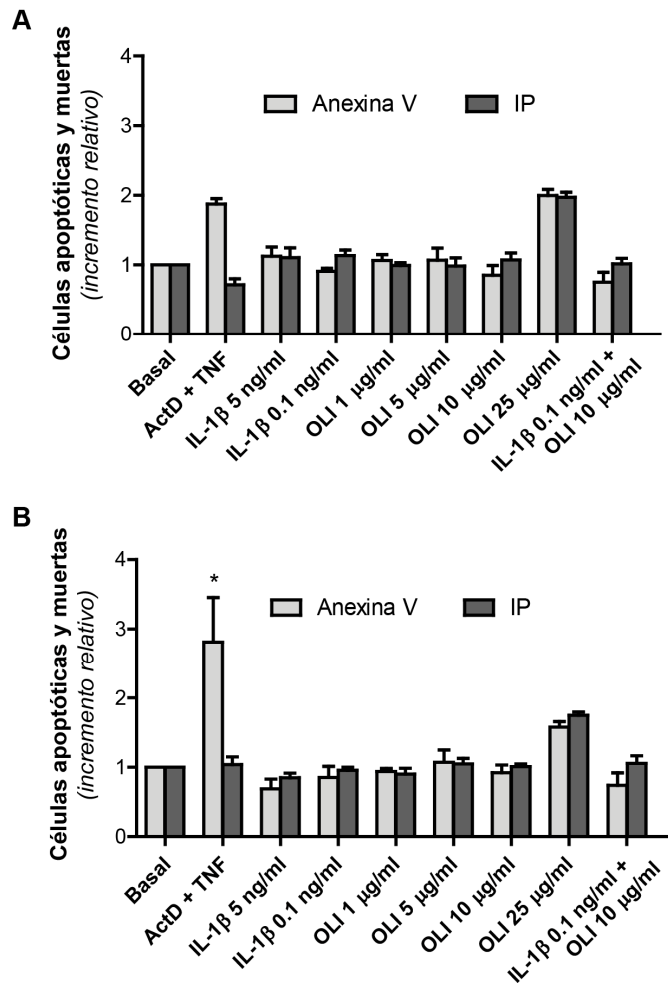


**Figura 39. Producción sinérgica de IL-8 en sinoviocitos humanos estimulados durante 9, 24 o 48 h.** Las células se trataron con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml durante 9, 24 o 48 h tras ser estimuladas durante 30 min con OLI 0.1  $\mu\text{g/ml}$  o 1  $\mu\text{g/ml}$ . Como referencia se utilizaron células tratadas con la habitual combinación de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml + OLI 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 9 h (línea roja punteada). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM del incremento en la liberación de IL-8 de condiciones señaladas respecto a IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml sola normalizada al 100% (n=2 experimentos independientes por duplicado).

Los resultados obtenidos en este apartado demuestran que la disfunción mitocondrial sensibiliza a los sinoviocitos de manera que responden de una forma exacerbada a la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . Además, las proporciones de este efecto sinérgico dependen del grado de disfunción mitocondrial y se mantiene en el tiempo.

### 3. VIABILIDAD CELULAR TRAS EL TRATAMIENTO DE LOS SINOVIOCITOS CON LOS ESTÍMULOS A ESTUDIO

Debido a que los experimentos de este trabajo implican la interrupción de rutas esenciales en la célula, resulta de suma importancia determinar si los estímulos utilizados o sus dosis provocan la muerte celular y descartar que sea esta vía la responsable de la liberación de mediadores inflamatorios. Cuando se estudió la viabilidad celular en términos de células en proceso de apoptosis o células muertas (mediante la determinación por citometría de la unión de anexina V o la permeabilidad a IP), no se encontraron diferencias respecto a la condición basal a los tiempos de estudio de 6 y 9 h. Tan sólo la dosis más alta de OLI (25 µg/ml) ejerce un efecto tóxico presentando un mayor porcentaje de células apoptóticas y muertas respecto al basal (Figura 40). Se incluye la combinación Actinomicina D + TNF $\alpha$  como control positivo de un inductor de muerte celular.



**Figura 40. Determinación de la muerte celular inducida por los estímulos empleados.** Los sinoviocitos se estimularon con dosis crecientes de OLI; con IL-1 $\beta$  5 ng/ml o 0.1 ng/ml; o con la combinación de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml + OLI 10  $\mu$ g/ml. La estimulación con actinomicina D (1  $\mu$ g/ml) + TNF $\alpha$  (10 ng/ml) (ActD + TNF) se utilizó como control positivo de muerte. Tras 6 h (**A**) o 9 h (**B**) de estimulación, los sinoviocitos se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas para anexina V (FL1) o IP (FL3). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM del incremento relativo a la condición basal (n=4; \* $P$ ≤0.05 vs. basal).

De esta manera, se confirmó que los estímulos a los que se sometieron los sinoviocitos no desencadenan el proceso de apoptosis en estas células a los tiempos y dosis evaluados.



#### **4. MEDIADORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL**

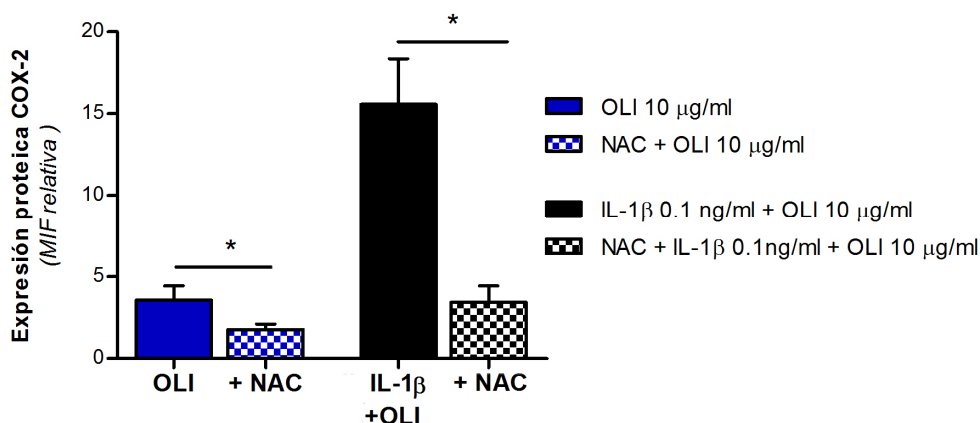
Tras demostrarse que la disfunción mitocondrial induce una respuesta inflamatoria en el sinoviocito humano en cultivo y que ésta se ve sinérgicamente amplificada en presencia de bajas dosis de IL-1 $\beta$ , en este apartado se pretende dilucidar cuáles son los mediadores de la ruta de transducción de señales que dan lugar a esta respuesta.

##### **4.1. Especies reactivas de oxígeno**

Las ROS actúan como segundos mensajeros en gran variedad de rutas de señalización celular. Por ello, se estudió en primer lugar el papel de ROS en el proceso de transducción de señales implicado en la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial. Como se ha descrito en el apartado 1.2, la disfunción mitocondrial induce un incremento significativo en la producción de ROS en las células sinoviales humanas. Además, es sabido que el estrés oxidativo puede llevar a la activación de factores de transcripción proinflamatorios sensibles al estado redox celular. Por ello, se investigó el efecto de la inhibición de las señales de ROS utilizando un “secuestrador” citoplasmático de ROS, N-acetilcisteína (NAC).

Los sinoviocitos se preincubaron durante 1 h con NAC (20 mM) y, a continuación, se estimularon según lo detallado en los apartados anteriores; es decir, tras 1 h de preincubación con NAC, las células se trataron con OLI durante 30 min y se estimularon con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml durante 6 h para estudiar la expresión proteica de COX-2 mediante citometría de flujo.

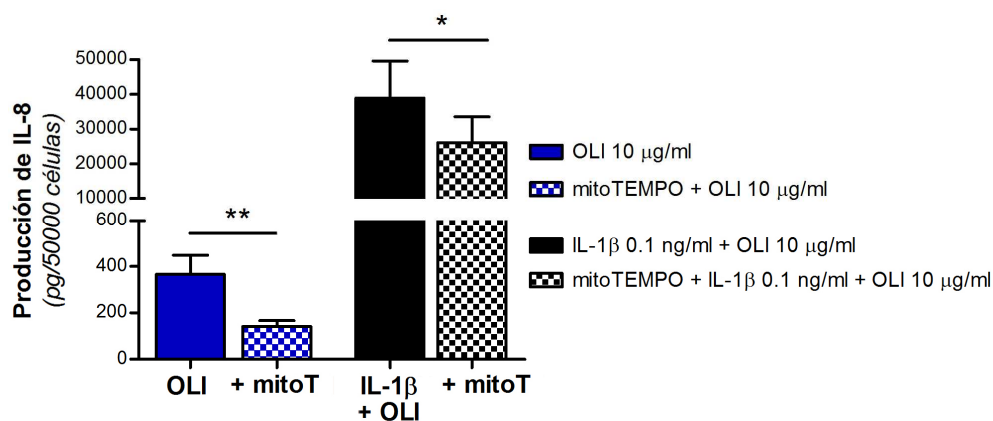
Los resultados mostraron una disminución de la expresión proteica de COX-2 inducida por OLI o la combinación de IL-1 $\beta$  + OLI cuando los sinoviocitos son pretratados con NAC (20 mM), indicando que la señalización por ROS juega un papel en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria (Figura 41).



**Figura 41. Efecto de la preincubación con NAC en la expresión de COX-2 inducida por OLI o la combinación IL-1 $\beta$  + OLI.** Los sinoviocitos se preincubaron o no durante 30 min con NAC (20 mM) antes de la estimulación con OLI o con IL-1 $\beta$  + OLI. Tras 6 h de incubación, se determinó la expresión de COX-2 mediante citometría de flujo. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) relativa al basal (n=5; \* $P \leq 0.05$ ).

A continuación, se estudió específicamente el papel de ROS mitocondriales. Para ello se empleó mitoTEMPO, una molécula con una alta carga positiva que se concentra en la matriz mitocondrial donde actúa como secuestrador selectivo de ROS mitocondriales.

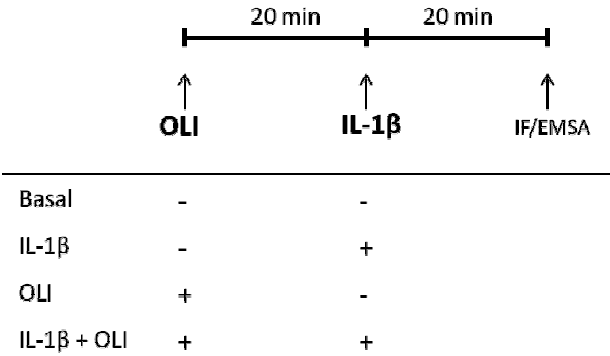
Cuando los sinoviocitos se preincubaron con mitoTEMPO (50  $\mu$ M) durante 1 h antes del tratamiento con OLI o con la combinación de IL-1 $\beta$  + OLI, los niveles de IL-8 en el medio se redujeron de manera significativa (Figura 42). Este resultado refleja la implicación específica de ROS mitocondriales en la respuesta inflamatoria inducida por OLI en los sinoviocitos humanos en cultivo.



**Figura 42.** Efecto de la preincubación con mitoTEMPO en la producción de IL-8 inducida por OLI o la combinación IL-1 $\beta$  + OLI. Los sinoviocitos se preincubaron o no durante 1 h con el antioxidante mitocondrial mitoTEMPO (50  $\mu$ M) antes de la estimulación con OLI o con IL-1 $\beta$  + OLI. Tras 9 h de incubación, se determinó la concentración de IL-8 en los sobrenadantes mediante ELISA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de la cantidad de IL-8 (en pg) liberada por  $5 \times 10^4$  células ( $n=6$ ; \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ ).

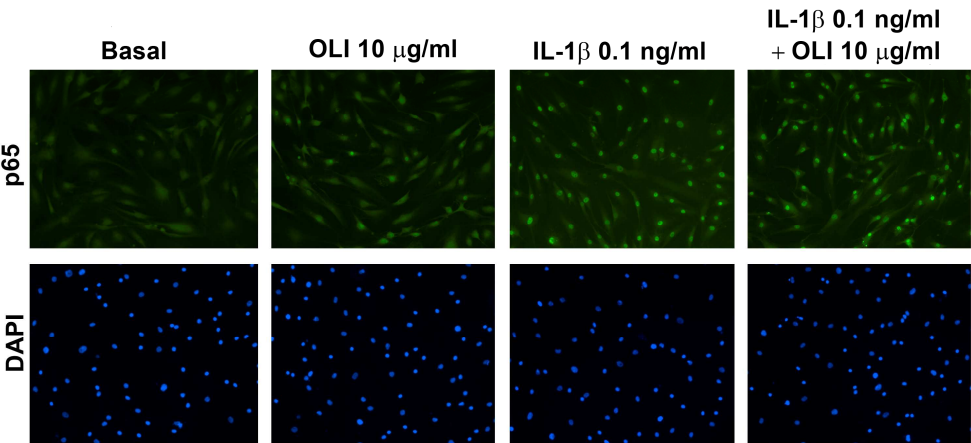
#### 4.2. Factor de transcripción NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción sensible al estado redox celular, y es el responsable de la activación de la transcripción de gran variedad de genes proinflamatorios, entre ellos COX-2 e IL-8. Para evaluar la posible implicación de NF- $\kappa$ B en la respuesta inflamatoria inducida por disfunción mitocondrial, en primer lugar se evaluó directamente la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a la disfunción mitocondrial y a la disfunción mitocondrial en combinación con IL-1 $\beta$  mediante estudios de inmunofluorescencia para detectar la expresión y traslocación de p65, una subunidad de NF- $\kappa$ B. El proceso de estimulación de las células sinoviales para este estudio se detalla en la Figura 43.



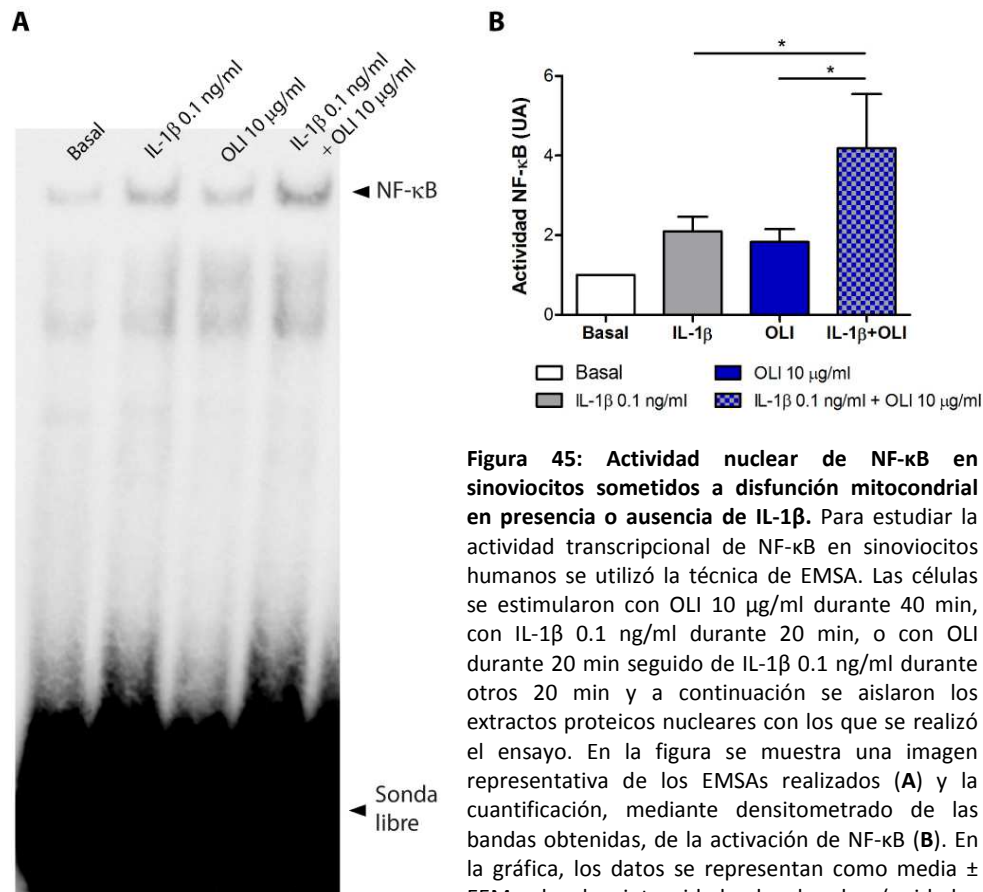
**Figura 43: Esquema del proceso experimental para el estudio de NF-κB.** El tiempo total de estimulación de los sinoviocitos para el estudio de la activación de NF-κB es de 40 min. Como en experimentos anteriores, se realiza un pretratamiento con OLI 10 µg/ml para inducir disfunción mitocondrial antes de la adición de IL-1β 0.1 ng/ml. Al final de la incubación se procede a la observación de resultados (IF, inmunofluorescencia; EMSA, ensayo de retardo en gel).

Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia mostraron niveles ligeramente mayores, tanto citoplasmáticos como nucleares, de p65 en sinoviocitos estimulados con OLI durante 40 min respecto a sinoviocitos sin estimular. Asimismo, IL-1β 0.1 ng/ml (20 min) induce una clara traslocación de p65 al núcleo. Cuando los sinoviocitos son preincubados con OLI durante 20 min antes de la adición de IL-1β durante otros 20 min, la intensidad de la fluorescencia en el núcleo aumenta con respecto a aquellos sin tratamiento con OLI (IL-1β 0.1 ng/ml sola), considerándose por tanto una mayor activación en la combinación de disfunción mitocondrial + IL-1β (Figura 44).



**Figura 44: Detección de p65 en células sometidas a disfunción mitocondrial en presencia o ausencia de IL-1β.** Se utilizó la técnica inmunofluorescencia para la detección de p65 en los sinoviocitos humanos en cultivo. Las células se sometieron a condiciones basales, se estimularon con OLI 10 µg/ml durante 40 min, se estimularon con IL-1β 0.1 ng/ml durante 20 min, o se estimularon con OLI durante 20 min seguido de IL-1β 0.1 ng/ml durante 20 min. La tinción con DAPI se utilizó para localizar los núcleos. Las imágenes (10X) son representativas de n=3 experimentos independientes.

A continuación se estudió la capacidad de unión de NF- $\kappa$ B al ADN mediante la técnica de EMSA siguiendo el mismo esquema experimental, obteniéndose resultados consistentes con los de traslocación al núcleo de p65. Se comprobó que existe un leve incremento de la actividad de NF- $\kappa$ B en presencia de OLI 10  $\mu$ g/ml. IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml indujo una mayor activación de NF- $\kappa$ B, que se incrementó ligera pero significativamente cuando los sinoviocitos fueron previamente sometidos a una disfunción mitocondrial (Figura 45).

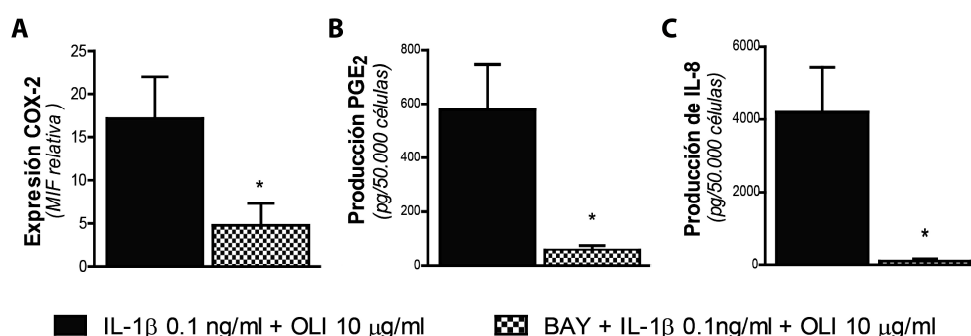


**Figura 45: Actividad nuclear de NF- $\kappa$ B en sinoviocitos sometidos a disfunción mitocondrial en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$ .** Para estudiar la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en sinoviocitos humanos se utilizó la técnica de EMSA. Las células se estimularon con OLI 10  $\mu$ g/ml durante 40 min, con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml durante 20 min, o con OLI durante 20 min seguido de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml durante otros 20 min y a continuación se aislaron los extractos proteicos nucleares con los que se realizó el ensayo. En la figura se muestra una imagen representativa de los EMSAs realizados (**A**) y la cuantificación, mediante densitometrado de las bandas obtenidas, de la activación de NF- $\kappa$ B (**B**). En la gráfica, los datos se representan como media  $\pm$  EEM de la intensidad de banda (unidades arbitrarias, UA) relativa a la condición basal normalizada a 1 (n=6; \* $P \leq 0.05$ ).

Una vez determinada la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a la disfunción mitocondrial y a la combinación de la disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ , se investigó la implicación de este factor en el desarrollo de la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial. Para realizar estos estudios se empleó el inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B BAY-

117085 (BAY, 7.5  $\mu$ M). Este compuesto previene la traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B a través de la inhibición de la fosforilación de I $\kappa$ B.

Como se observa en la Figura 46, la preincubación de los sinoviocitos con BAY 7.5  $\mu$ M durante 1 h previa a la inducción del modelo de disfunción mitocondrial en combinación con IL-1 $\beta$  resultó en una disminución significativa de la expresión de COX-2 (inhibición del 72%), la producción de PGE<sub>2</sub> (inhibición del 90%) y la liberación de IL-8 (inhibición del 98%) respecto a la condición control (sin inhibidor).



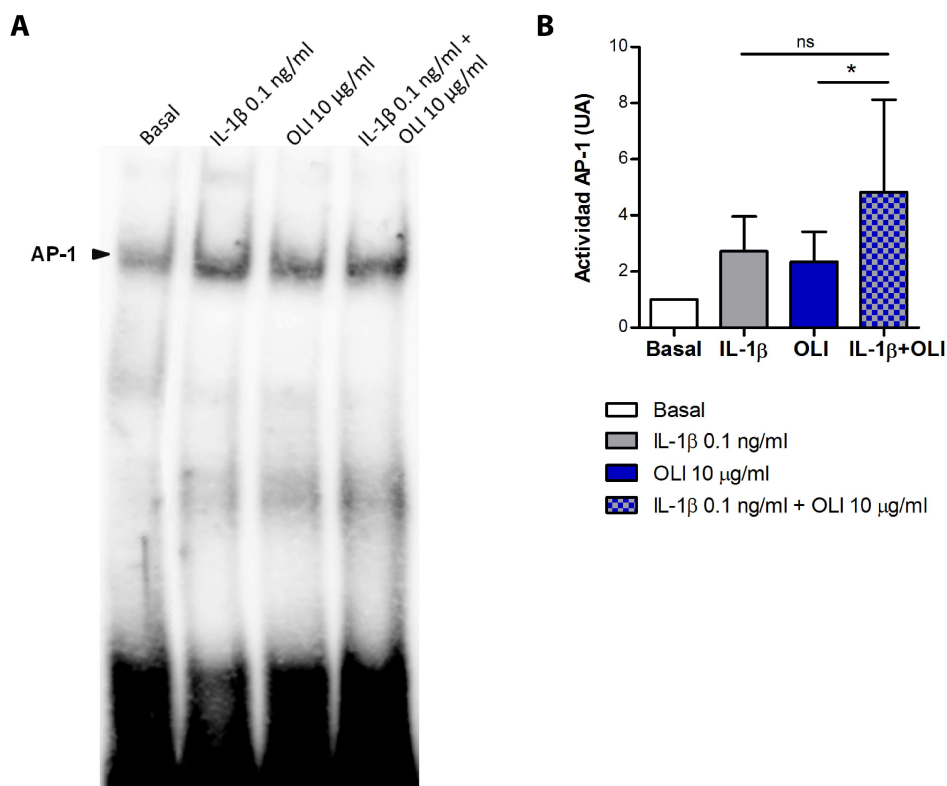
**Figura 46. Efecto de la preincubación con BAY en la respuesta inflamatoria inducida por la combinación de IL-1 $\beta$  + OLI.** Los sinoviocitos se preincubaron durante 1 h en presencia o ausencia del inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B, BAY (7.5  $\mu$ M) antes de la estimulación con IL-1 $\beta$  + OLI. **A.** Tras 6 h de incubación, se determinó la expresión de COX-2 en las células mediante citometría de flujo. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) relativa (n=6; \* $P$ ≤0.05). **B.** Se cuantificó la liberación de PGE<sub>2</sub> mediante ELISA tras 9 h de incubación. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de la cantidad de PGE<sub>2</sub> (en pg) liberada por 5x10<sup>4</sup> células (n=3 experimentos independientes en duplicado; \* $P$ ≤0.05). **C.** A las 9 h de incubación se determinó la concentración de IL-8 en los sobrenadantes mediante ELISA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de la cantidad de IL-8 (en pg) liberada por 5x10<sup>4</sup> células (n=3 experimentos independientes en duplicado; \* $P$ ≤0.05).

#### 4.3. Otros factores de transcripción: AP-1 y Nrf2

Otro factor de transcripción también implicado en el desarrollo de la respuesta inflamatoria es AP-1. Por ello, también se ha estudiado este factor de transcripción como posible mediador del proceso inflamatorio inducido por la disfunción mitocondrial.

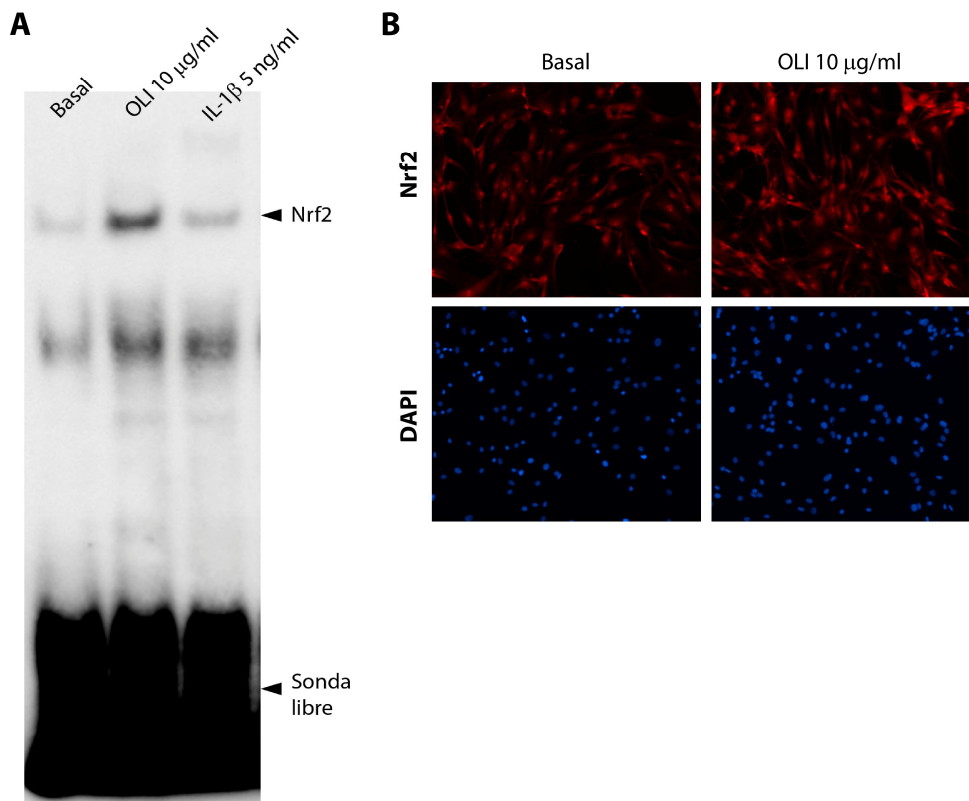
El proceso experimental para determinar la activación de este factor de transcripción en sinoviocitos humanos sometidos a disfunción mitocondrial y en presencia o no de IL-1 $\beta$  es similar al descrito en la Figura 43 para el estudio de NF- $\kappa$ B. Como se observa en la Figura 47, la actividad de AP-1 evaluada mediante EMSA muestra un incremento en aquellas células

sometidas a disfunción mitocondrial. Esta actividad se ve ligeramente incrementada cuando las células con disfunción mitocondrial se incuban en presencia de IL-1 $\beta$ .



**Figura 47: Actividad del factor de transcripción AP-1 en sinoviocitos sometidos a disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ .** La actividad transcripcional de AP-1 se determinó en sinoviocitos humanos mediante EMSA. Las células se estimularon con OLI 10  $\mu$ g/ml durante 40 min, con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml durante 20 min, o con OLI durante 20 min seguido de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml durante otros 20 min y a continuación se aislaron los extractos proteicos nucleares con los que se realizó el ensayo. En la figura se muestra una imagen representativa de los EMSAs de AP-1 (**A**) y la cuantificación, mediante densitometrado de las bandas (**B**). En la gráfica, los datos se representan como media  $\pm$  EEM de la intensidad de banda (unidades arbitrarias, UA) relativa a la condición basal normalizada a 1 (n=3; \* $P \leq 0.05$ ).

Por su parte, Nrf2 es un factor de respuesta antioxidante que se ve activado en situaciones de estrés oxidativo para llevar a cabo la transcripción de genes detoxificantes y de defensa antioxidante en un intento de recuperar la homeostasis celular. Como se muestra en la Figura 48, se ha encontrado que los sinoviocitos sometidos a una disfunción mitocondrial inducida por tratamiento con OLI durante 3 h muestran una mayor presencia nuclear de Nrf2.



**Figura 48: Actividad del factor de transcripción Nrf2 en sinoviocitos sometidos a disfunción mitocondrial.** A. La actividad transcripcional de Nrf2 se determinó en sinoviocitos humanos mediante EMSA. Las células se estimularon con OLI 10 µg/ml o con IL-1β 5 ng/ml durante 3 h, y a continuación se aislaron los extractos proteicos nucleares con los que se realizó el ensayo. B. Se realizó una inmunofluorescencia de Nrf2 en sinoviocitos tratados con OLI 10 µg/ml durante 3 h. Se muestran imágenes representativas de n=3 experimentos independientes. Las imágenes se tomaron a una magnificación de 10X.

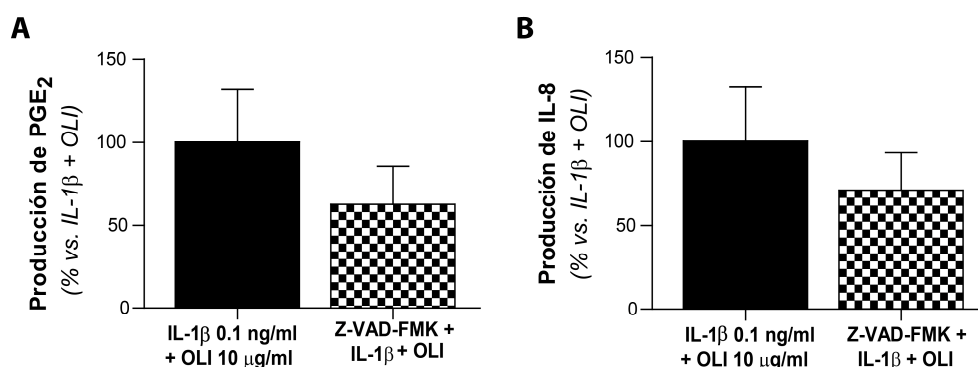
#### 4.4. Implicación de la ruta apoptótica en la respuesta inflamatoria inducida por disfunción mitocondrial

El daño mitocondrial está directamente relacionado con la activación de rutas apoptóticas mediante activación de caspasas. La activación de la caspasa-1 constituye un paso clave en la activación del inflamasoma y el desencadenamiento de esta ruta implicaría un aumento en la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1β, IL-18). Esto, junto con la ruta de NF-κB puede provocar un considerable refuerzo de la respuesta inflamatoria.

Por ello, se estudió la implicación de las caspasas en la respuesta inflamatoria obtenida bajo condiciones de disfunción mitocondrial y presencia de IL-1β. Como se muestra en la Figura



49, la preincubación de los sinoviocitos con el inhibidor de caspasas general Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M) durante 2 h presenta una tendencia a la reducción de la producción de PGE<sub>2</sub> e IL-8 inducida por IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml + OLI 10  $\mu$ g/ml, lo que parece apuntar a que las caspasas podrían desempeñar un papel en la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial en sinoviocitos humanos.



**Figura 49: Efecto del inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK en la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$  en sinoviocitos humanos en cultivo.** La liberación de PGE<sub>2</sub> (A) y de IL-8 (B) se cuantificó en sobrenadantes obtenidos de sinoviocitos preincubados o no durante 2 h con el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M) antes del tratamiento con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml + OLI 10  $\mu$ g/ml durante 9 h. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM del porcentaje de producción PGE<sub>2</sub> o IL-8 respecto a la condición sin inhibidor de caspasas (n=3).

En conjunto, los resultados de este apartado identifican a las ROS y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B como mediadores involucrados en la liberación de mediadores inflamatorios inducida por disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ . Otro factor proinflamatorio (AP-1) y antiinflamatorio (Nrf2) se activan bajo estas condiciones. La activación de caspasas podría estar involucrada en la activación sinérgica de la ruta inflamatoria.

## 5. REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS CON OTROS INDUCTORES DE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL: ANTIMICINA A Y PARAQUAT

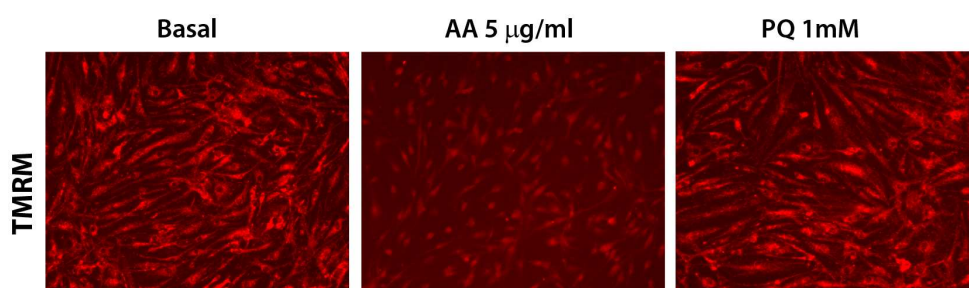
A lo largo de este apartado, se muestran los resultados obtenidos cuando se estimularon los sinoviocitos con otros inhibidores de la función mitocondrial distintos a OLI. En concreto, se empleó antimicina A (AA, un inhibidor del complejo III de la CRM) y paraquat (PQ, un prooxidante mitocondrial).

En relación al complejo III, este es, junto con el complejo I, el lugar de mayor producción de ROS de la mitocondria. La interrupción del flujo de electrones a través de la CRM en el complejo III produce una mayor cantidad de electrones desapareados susceptibles de formar radicales libres de oxígeno.

El PQ es un herbicida ampliamente utilizado y altamente tóxico. PQ genera un incremento en el flujo del radical  $O_2^-$  especialmente a nivel del complejo I de la CRM y produce, por tanto, un aumento del daño oxidativo mitocondrial.

### 5.1. Inducción de disfunción mitocondrial mediante el uso de AA y PQ

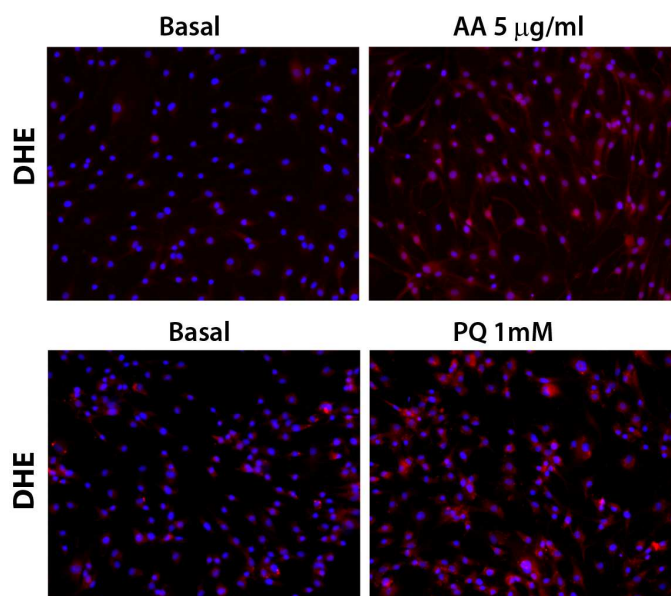
Se comprobó en primer lugar la capacidad de AA y PQ para inducir disfunción mitocondrial. Para ello, se determinó el  $\Delta\Psi_m$  en sinoviocitos estimulados con ambos inhibidores. Cuando los sinoviocitos se incubaron durante 9 h con AA (5  $\mu\text{g/ml}$ ), se indujo una gran despolarización mitocondrial. Por el contrario, PQ (1 mM) sólo mostró una ligera disminución del  $\Delta\Psi_m$  al tiempo evaluado (Figura 50).



**Figura 50. Determinación del  $\Delta\Psi_m$  en sinoviocitos tratados con AA y PQ.** El  $\Delta\Psi_m$  se determinó en sinoviocitos humanos expuestos a AA 5  $\mu\text{g/ml}$  o PQ 1mM durante 9 h usando la sonda fluorescente TMRM (20 nM). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio invertido a una magnificación de 10X. Son representativas de n=2 experimentos independientes.

## 5.2. Producción de ROS inducida por AA y PQ

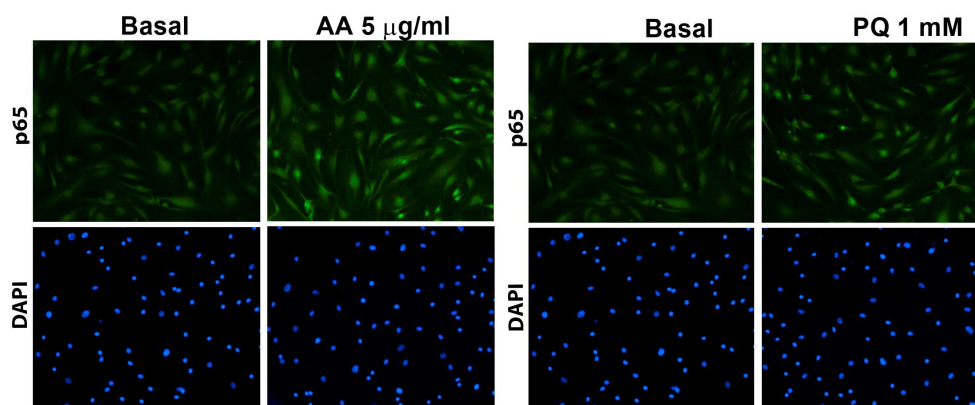
La producción de ROS se evaluó mediante marcaje con DHE, de manera que se determinaron los ROS celulares. Cuando los sinoviocitos se estimularon durante 30 min con los inhibidores mitocondriales AA o PQ, se produjo un aumento significativo en la fluorescencia de DHE respecto a la condición basal (Figura 51).



**Figura 51. Determinación de la producción de superóxido en sinoviocitos tratados con AA y PQ.** Los sinoviocitos humanos se incubaron bajo condiciones basales o con AA 5 µg/ml o PQ 1 mM durante 30 min. La producción de ROS se determinó usando la sonda fluorescente DHE. Las imágenes mostradas (10X) son representativas de n=2 experimentos independientes.

## 5.3. Activación de NF-κB inducida por AA y PQ

El grado de activación del factor de transcripción NF-κB fue objeto de estudio en los sinoviocitos tratados con AA o PQ. Como se ha demostrado, tanto AA como PQ son capaces de provocar estrés oxidativo, que a su vez podría inducir la activación de un factor de transcripción sensible al estado redox como NF-κB. Para comprobarlo se estudió, mediante inmunofluorescencia, la traslocación al núcleo de la subunidad p65 en sinoviocitos estimulados con AA 5 µg/ml o con PQ 1 mM (Figura 52).



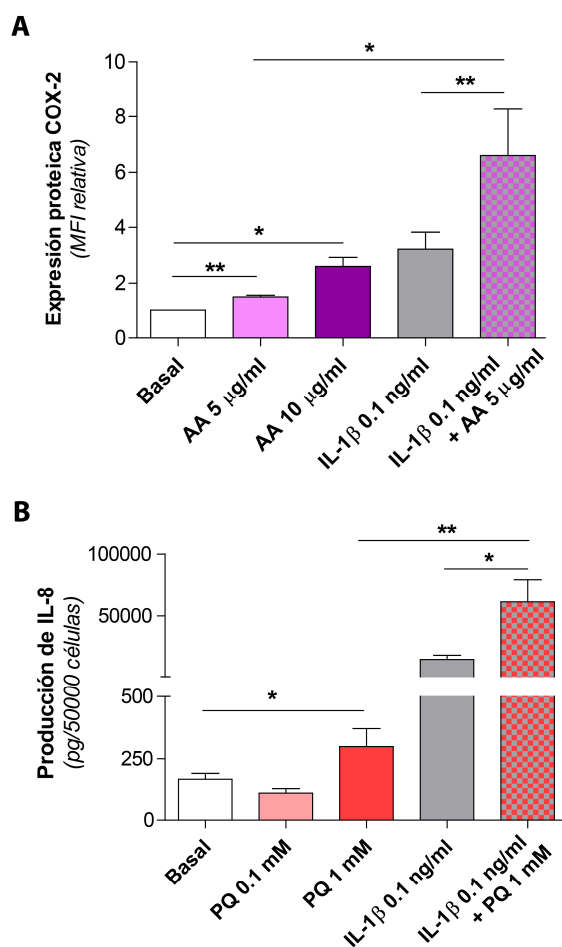
**Figura 52. Estudio de la expresión y traslocación de p65 en sinoviocitos tratados con AA y PQ.** La subunidad de NF- $\kappa$ B, p65, se detectó mediante inmunofluorescencia en sinoviocitos estimulados durante 40 min con AA 5  $\mu$ g/ml o PQ 1 mM. Para colocalizar núcleos y como control del número de células se realizó una contratinción con DAPI (abajo). Las imágenes mostradas son representativas de n=2 experimentos independientes.

En las imágenes de la Figura 52, se observa una mayor señal tanto nuclear como citoplasmática en los sinoviocitos tratados con AA o PQ en comparación con sus respectivos basales. La subunidad p65 se concentra más en el núcleo, presentando éste una señal más intensa que en condiciones basales, lo que indica una mayor actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B.

#### 5.4. Efecto de AA y PQ en la respuesta inflamatoria de sinoviocitos humanos en cultivo

Una vez determinado que AA y PQ son capaces, al igual de OLI, de inducir una disfunción mitocondrial que lleva a la producción de ROS y una ligera activación de NF- $\kappa$ B, se determinó su efecto en la expresión de los mediadores inflamatorios COX-2 e IL-8 en el sinoviocito humano en cultivo. Como se observa en la Figura 53A, AA induce por sí sola un incremento dosis-dependiente en la expresión de COX-2 evaluada mediante citometría de flujo tras 6 h de estimulación. Además, cuando se induce disfunción mitocondrial con AA 5  $\mu$ g/ml durante 30 min previamente a la estimulación con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml, la expresión de COX-2 se incrementa sinérgicamente, al igual que lo encontrado con OLI.

Por su parte, PQ es capaz de inducir un leve pero significativo incremento en la producción de IL-8, evaluada mediante ELISA, a la dosis de 1 mM tras 9 h de incubación. Además, cuando las células se preincubaron con PQ antes de estimular con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml, se produjo un efecto sinérgico de gran magnitud, superando en más de 4 veces la producción de IL-8 inducida por IL-1 $\beta$  sola (Figura 53B).



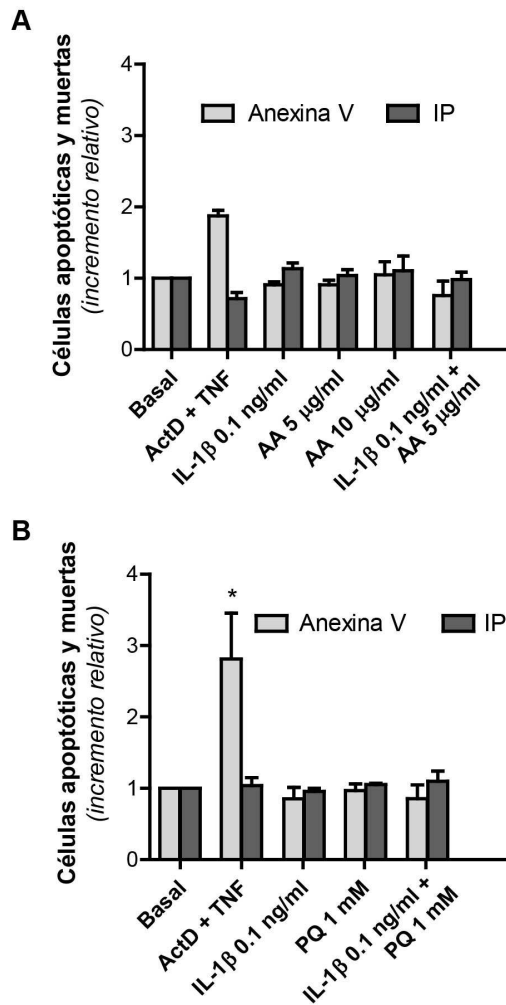
**Figura 53. Efecto de AA y PQ en la inducción de COX-2 e IL-8, respectivamente, en sinoviocitos humanos.**

**A.** La expresión proteica de COX-2 se evaluó en sinoviocitos tratados durante 6 h con AA (5 µg/ml y 10 µg/ml), IL-1β 0.1 ng/ml, o IL-1β 0.1 ng/ml + AA 5 µg/ml. Los datos se expresan como la media ± EEM de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) relativa al basal, normalizado a 1 (n=5). **B.** La liberación de IL-8 se cuantificó tras 9 h de incubación con PQ (0.1 mM y 1 mM), IL-1β 0.1 ng/ml, o IL-1β 0.1 ng/ml + PQ 1 mM. Los datos se expresan como la media ± EEM de la cantidad de IL-8 (en pg) liberada por  $5 \times 10^4$  células (n=5). \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ .

### 5.5. Viabilidad celular en los sinoviocitos tratados con AA o PQ

Como ya se ha mencionado en el apartado 3, resulta de especial relevancia en los estudios de inhibición de la función mitocondrial comprobar que las células no están sufriendo procesos de muerte.

Como se observa en la Figura 54, la incubación con los inhibidores mitocondriales AA o PQ, solos o en combinación con IL-1β, no provocó ningún cambio significativo en el porcentaje de células en proceso de apoptosis respecto a la condición basal.



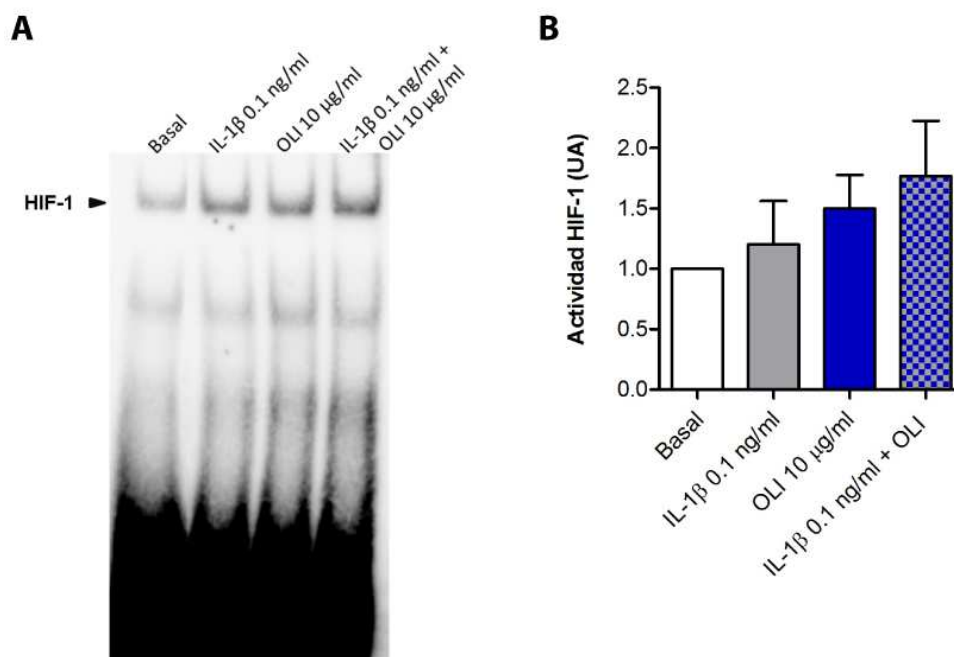
**Figura 54. Determinación de la muerte celular inducida por AA o PQ en presencia o ausencia de IL-1β.** Los sinoviocitos se estimularon con los inhibidores mitocondriales AA y PQ solos; con IL-1β 0.1 ng/ml; o con la combinación de IL-1β 0.1 ng/ml con cada inhibidor mitocondrial. La estimulación con actinomicina D (1 μg/ml) + TNFα (10 ng/ml) (ActD + TNF) se utilizó como control positivo de muerte por apoptosis. Tras 6 h (**A**) o 9 h (**B**) de estimulación, los sinoviocitos se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas para anexina V (FL1) y para IP (FL3). Los resultados se expresan como la media ± EEM del incremento relativo a la condición basal, normalizada a 1 (n=4; \*P≤0.05 vs. basal).

Por tanto, los resultados con AA y PQ demuestran que estos inhibidores mitocondriales pueden provocar en los sinoviocitos respuestas inflamatorias similares a las encontradas con OLI, apoyando la hipótesis de que la disfunción mitocondrial amplifica la respuesta inflamatoria inducida por IL-1β en sinoviocitos humanos normales en cultivo.

## 6. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SOBRE LA RESPUESTA ANGIOGÉNICA DE LOS SINOVIOCITOS HUMANOS NORMALES EN CULTIVO

### 6.1. Estudio de la activación del factor de transcripción HIF-1 en sinoviocitos con disfunción mitocondrial

La angiogénesis es un proceso esencial en la formación y mantenimiento del *pannus* invasivo característico de la sinovial AR, y se ha demostrado que VEGF juega un papel central en este proceso. La disfunción mitocondrial, y el estrés oxidativo asociado, se relacionan con los niveles de HIF-1, un factor clave en la transcripción génica de VEGF. Por ello, en este apartado, se ha estudiado la relación entre la disfunción mitocondrial en sinoviocitos y la expresión de VEGF. Para ello, se ha estudiado en primer lugar la activación de HIF-1, el principal factor de transcripción involucrado en la inducción de la transcripción de VEGF y otros genes relacionados con la respuesta angiogénica, como las MMPs o también de la IL-8. En el EMSA de la Figura 55 se puede observar cómo la disfunción mitocondrial inducida por OLI es capaz de provocar una clara inducción de la actividad nuclear de HIF-1. Esta actividad inducida por OLI se ve levemente incrementada cuando las células están expuestas a IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml.

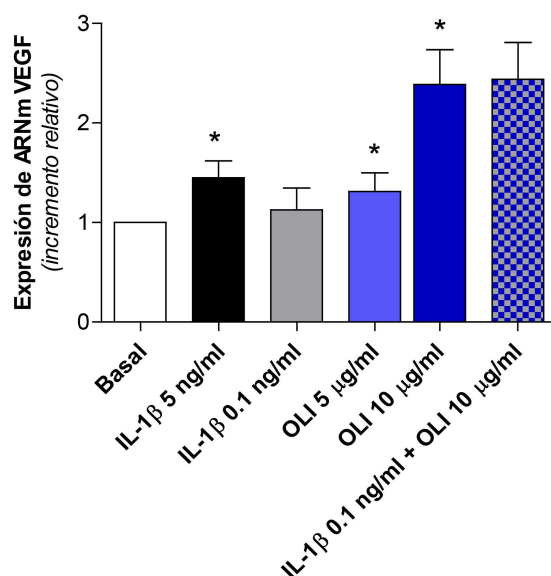


**Figura 55: Actividad del factor de transcripción HIF-1 en sinoviocitos sometidos a disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ .** La actividad transcripcional de HIF-1 se determinó en sinoviocitos humanos mediante EMSA. Las células se estimularon con OLI 10  $\mu$ g/ml durante 40 min, con IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml durante 20 min, o con OLI durante 20 min seguido de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml durante otros 20 min y, a continuación, se aislaron los extractos proteicos nucleares con los que se realizó el ensayo. En la figura se muestra una imagen representativa del EMSA de HIF-1 (**A**) y la cuantificación, mediante densitometrado de las bandas (**B**). En la gráfica, los datos se representan como media  $\pm$  EEM de la intensidad de banda (unidades arbitrarias, UA) relativa a la condición basal normalizada a 1 (n=3).

## 6.2. Estudio de la expresión de VEGF en sinoviocitos humanos con disfunción mitocondrial

A continuación, se evaluaron los niveles de expresión de VEGF. Los resultados obtenidos mostraron que la exposición de los sinoviocitos durante 24 h a OLI provoca un aumento significativo de la expresión de ARNm de VEGF, llegando incluso a superar la expresión inducida por la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  5 ng/ml. La presencia de IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml en el medio no supuso una diferencia significativa en la expresión de VEGF inducida por los sinoviocitos con disfunción mitocondrial (Figura 56).





**Figura 56. Efecto de la disfunción mitocondrial en la expresión génica de VEGF.** La expresión de ARNm de VEGF se cuantificó tras 24 h de estimulación con IL-1 $\beta$  5 ng/ml (control positivo), IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml o con dosis crecientes de OLI y la combinación IL-1 $\beta$  0.1 ng/ml + OLI 10  $\mu$ g/ml. Los resultados se expresan como veces de incremento relativo a la condición basal, normalizada a 1 (n=6; \* $P \leq 0.05$  vs. basal).

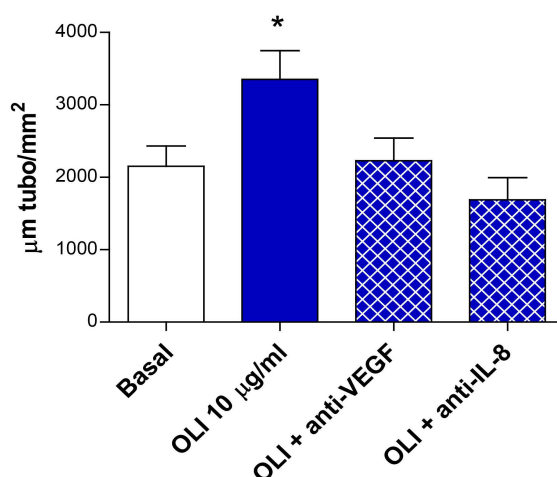
### 6.3. Estudio de la capacidad de los sinoviocitos con disfunción mitocondrial para inducir la formación de tubos en células endoteliales

Por último, se realizó un ensayo funcional para comprobar la capacidad de los sinoviocitos con disfunción mitocondrial para inducir angiogénesis en células endoteliales. Para ello, células endoteliales humanas se incubaron con los sobrenadantes obtenidos tras la incubación de los sinoviocitos con OLI durante 24 h y se determinó la capacidad de formación de tubos, una característica esencial del proceso de angiogénesis. Como se puede observar en la Figura 57, las células endoteliales incubadas con sobrenadantes procedentes de sinoviocitos con disfunción mitocondrial mostraron un mayor nivel de formación de estructuras tubulares.

VEGF es un factor clave en el proceso de angiogénesis y, por tanto, en la formación de tubos. La mayor formación de tubos en la condición con el sobrenadante obtenido de sinoviocitos con disfunción mitocondrial probablemente se debería a que éstos secretan una mayor cantidad de VEGF y otros factores angiogénicos, como IL-8, al medio. Para comprobarlo, los sobrenadantes obtenidos de sinoviocitos tratados con OLI se incubaron con anticuerpos anti-VEGF y anti-IL-8 durante 1 h a 37 °C. Se produjo, por tanto, una neutralización de estos dos

factores angiogénicos previa a la incubación del sobrenadante con las células endoteliales. Tras 24 h con las células endoteliales en una matriz tridimensional, se comprobó que el aumento en la formación de tubos inducido por los sobrenadantes con OLI apenas tuvo lugar cuando VEGF o IL-8 habían sido previamente bloqueados (Figura 57). Como control, también se incubaron los sobrenadantes procedentes de células estimuladas con OLI con una IgG control, y se observó que no produjo ningún cambio en el nivel de formación de tubos respecto a la condición con OLI. Estos datos confirman que la secreción de los mediadores angiogénicos VEGF e IL-8 por los sinoviocitos con disfunción mitocondrial es en parte responsable de la inducción de la respuesta angiogénica.

Se ha descartado que los efectos encontrados puedan ser debidos a la interacción directa de OLI con las células endoteliales. Este tipo de control se realizó mediante ensayos de formación de tubos con medio de cultivo incubado durante 24 h en placas sin sinoviocitos pero con los estímulos correspondientes. En estas condiciones, no se detectó ninguna diferencia en el grado de formación de tubos entre los “sobrenadantes” basales o con OLI.



**Figura 57. Ensayo de formación de tubos endoteliales mediado por los sobrenadantes de sinoviocitos con disfunción mitocondrial.** La formación de tubos endoteliales se cuantificó tras 24 h de incubación de las células endoteliales en una matriz tridimensional en contacto con los sobrenadantes obtenidos del cultivo de sinoviocitos durante 24 h bajo condiciones basales o en presencia de OLI (n=3). El efecto de VEGF e IL-8 se evaluó inactivando estos mediadores con anticuerpos de ratón específicos (n=2). Los resultados se muestran como la media ± EEM de la longitud total de tubos formados (en µm) por mm<sup>2</sup> en cada condición (\*P≤0.05).

Estos resultados demuestran que la disfunción mitocondrial provoca en los sinoviocitos una respuesta de características angiogénicas, al inducir la activación de HIF-1 así como un incremento en la expresión de VEGF. Esta respuesta de los sinoviocitos con disfunción mitocondrial induce la formación de tubos en las células endoteliales.

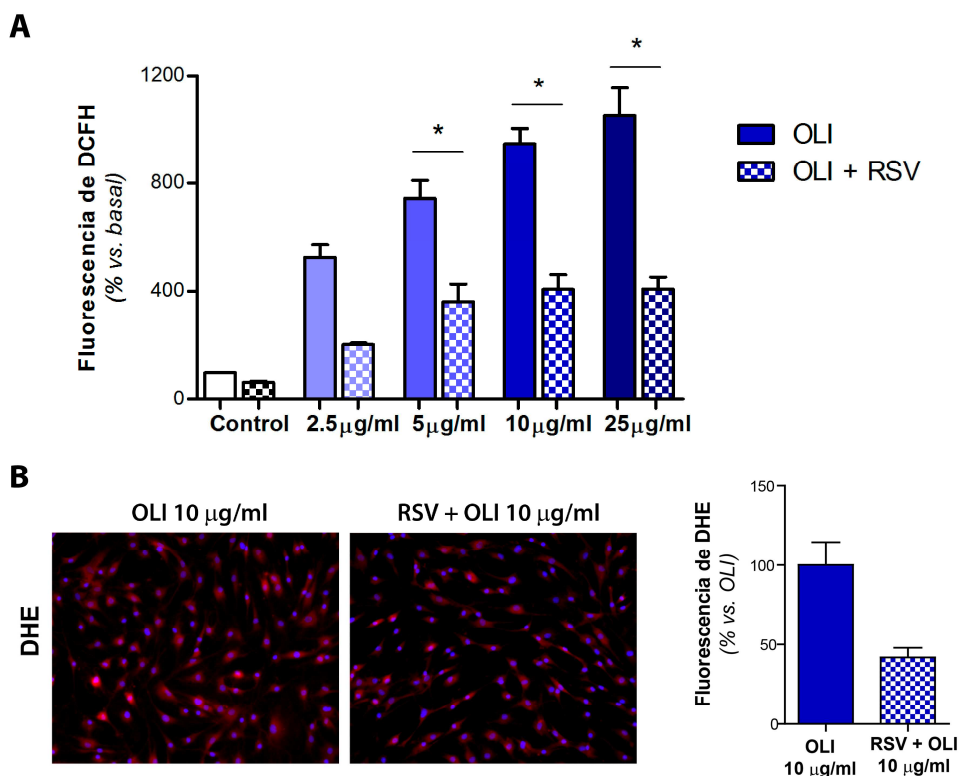
## 7. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA PATOLÓGICA INDUCIDA POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

El RSV ha mostrado poseer propiedades antiinflamatorias y antioxidantes en numerosos estudios a lo largo de los últimos años. En este estudio se evaluó la capacidad de este compuesto para prevenir los efectos proinflamatorios de la disfunción mitocondrial en los sinoviocitos humanos normales en cultivo.

### 7.1. Efecto del RSV sobre la producción de ROS inducida por OLI

Se evaluó en primer lugar la capacidad antioxidante del RSV en sinoviocitos expuestos a dosis crecientes de OLI durante 15 min. Para ello, se determinó la producción de  $H_2O_2$  (intensidad de fluorescencia de DCFH evaluada mediante citometría de flujo) inducida con cada dosis de OLI frente a la misma dosis pretratada con RSV durante 30 min. En la Figura 58A se puede observar una reducción de la producción de ROS inducida por todas las dosis de OLI de entre el 50 y el 60% en las células sinoviales pretratadas con RSV (\* $P \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).

Se obtuvieron resultados similares cuando se determinó la producción de  $O_2^-$  empleando el fluoróforo DHE. Como se observa en la Figura 58B, se produjo una disminución de la intensidad de fluorescencia de DHE en las células que fueron pretratadas con RSV antes de la estimulación con OLI.



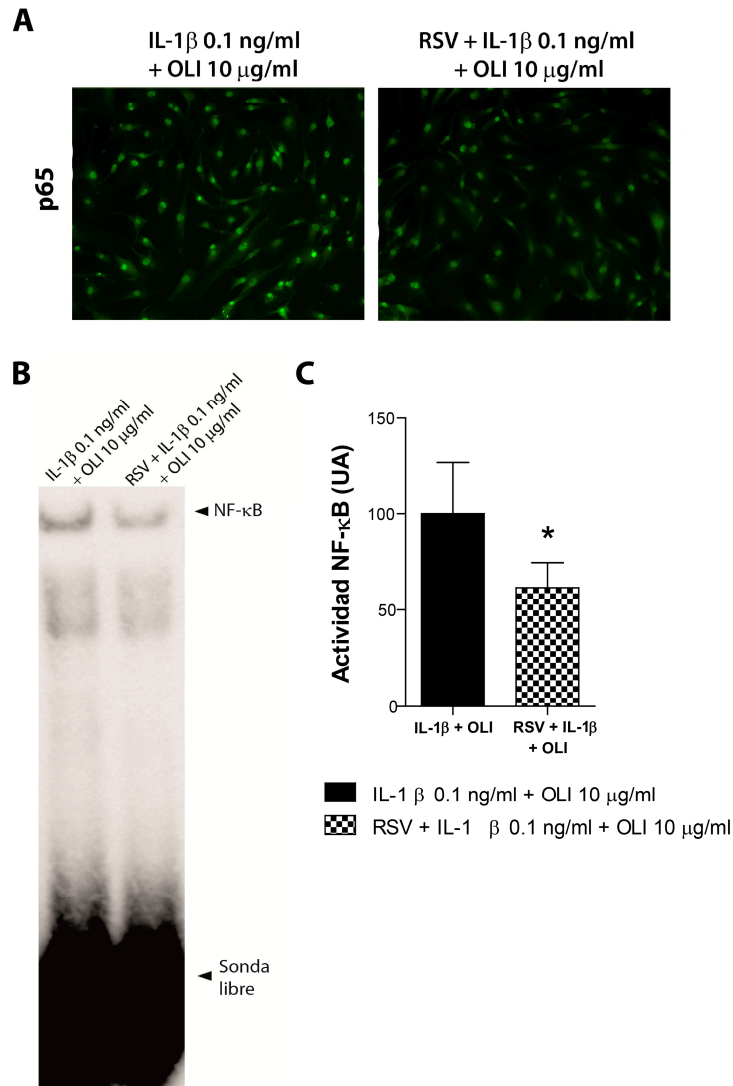
**Figura 58. Efecto del RSV en la producción de ROS inducida por la disfunción mitocondrial. A.** Se evaluó la producción de  $H_2O_2$  mediante citometría de flujo en sinoviocitos estimulados con dosis crecientes de OLI durante 15 min y preincubados o no con RSV (50  $\mu$ M) durante 30 min ( $n=6$ ,  $*P\leq 0.05$ ). **B.** La producción de  $O_2^-$  celular se determinó mediante coincubación de las células con DHE (10  $\mu$ M). Los sinoviocitos fueron preincubados o no con RSV (50  $\mu$ M) durante 30 min antes de la incubación con OLI durante otros 30 min, en los que se añadió el DHE. A la izquierda se muestran imágenes de fluorescencia representativas de los experimentos realizados (10X). A la derecha, la gráfica representa la media  $\pm$  EEM del porcentaje de la intensidad de fluorescencia de la condición preincubada con RSV respecto a la no preincubada ( $n=2$ ).

## 7.2. Efecto del RSV sobre la activación de NF- $\kappa$ B inducida por OLI

En otros estudios se ha demostrado que el RSV puede modificar la actividad de factores de transcripción incluyendo NF- $\kappa$ B. En este apartado se evaluó esta interacción en las células sinoviales sometidas a disfunción mitocondrial más IL-1 $\beta$ . La actividad NF- $\kappa$ B se determinó mediante inmunofluorescencia de p65 y EMSA en sinoviocitos expuestos o no a un pretratamiento con RSV.

En la Figura 59A se muestra una inmunofluorescencia representativa de la subunidad p65 en sinoviocitos estimulados con IL-1 $\beta$  + OLI o estimulados con IL-1 $\beta$  + OLI tras una

preincubación de 30 min con RSV. En la imagen se puede observar una atenuación de la positividad de p65 en el núcleo de aquellas células preincubadas con RSV respecto a su condición control. La Figura 59B muestra una imagen representativa de EMSA de extractos nucleares procedentes de sinoviocitos bajo las mismas condiciones. El densitometrado de las bandas de retardo del EMSA (n=5) muestra una reducción significativa en la señal de NF- $\kappa$ B de aproximadamente un 45% (Figura 59C).



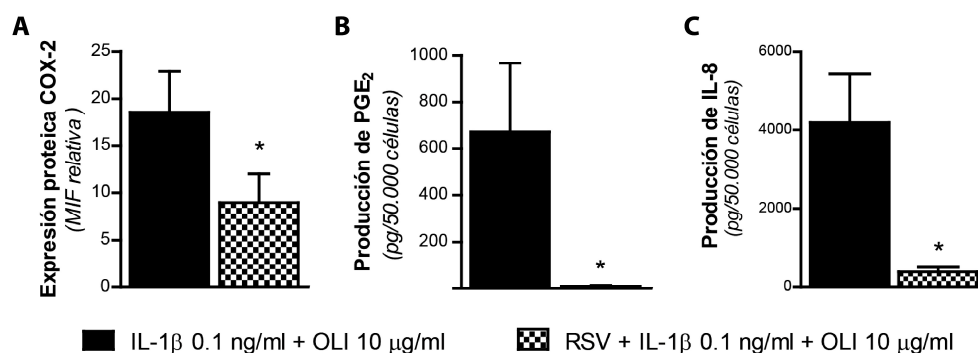
**Figura 59. Efecto del RSV en la activación de NF- $\kappa$ B inducida por la disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ .** **A.** Se evaluó la traslocación de p65 al núcleo mediante inmunofluorescencia en sinoviocitos preincubados o no con RSV (50  $\mu$ M) durante 30 min antes de ser tratados con la combinación de IL-1 $\beta$  + OLI. Imagen representativa de n=3 experimentos independientes. **B.** Imagen representativa de EMSA en la que se muestra la intensidad de unión de NF- $\kappa$ B al ADN en extractos nucleares procedentes de sinoviocitos tratados con IL-1 $\beta$  + OLI o sinoviocitos preincubados con

RSV (50  $\mu$ M) antes del tratamiento con IL-1 $\beta$  + OLI (n=5). **C.** La gráfica muestra los niveles de unión de NF- $\kappa$ B al ADN en los ensayos de EMSA, expresados como media  $\pm$  EEM del porcentaje de la intensidad de las bandas de la condición preincubada con RSV respecto a la no preincubada (n=5, \* $P \leq 0.05$ ).

### 7.3. Efecto del RSV sobre la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por disfunción mitocondrial

A continuación, se valoró la capacidad antiinflamatoria del RSV mediante la cuantificación de la expresión de los mediadores inflamatorios del estudio (COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8) inducida por la disfunción mitocondrial en combinación con IL-1 $\beta$ .

Tras el estudio de los tres mediadores citados, se comprobó que el RSV es capaz de prevenir significativamente la respuesta inflamatoria inducida por IL-1 $\beta$  + OLI (Figura 60). Concretamente, el RSV produjo aproximadamente una reducción del 52% en la expresión de COX-2 y una disminución de hasta el 99% y el 91% en el caso de la producción de PGE<sub>2</sub> y de IL-8, respectivamente.



**Figura 60. Efecto del RSV en la modulación de la respuesta inflamatoria inducida por la combinación de IL-1 $\beta$  + OLI.** Los sinoviocitos se preincubaron o no durante 30 min con RSV (50  $\mu$ M) antes de la estimulación con IL-1 $\beta$  + OLI. **A.** Tras 6 h de incubación, se determinó la expresión de COX-2 en las células mediante citometría de flujo. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) relativa (n=7; \* $P \leq 0.05$ ). **B.** Se cuantificó la liberación de PGE<sub>2</sub> tras 9 h de incubación mediante ELISA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de la cantidad de PGE<sub>2</sub> (en pg) liberada por  $5 \times 10^4$  células (n=3 experimentos independientes en duplicado; \* $P \leq 0.05$ ). **C.** A las 9 h de incubación se determinó la concentración de IL-8 en los sobrenadantes mediante ELISA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de la cantidad de IL-8 (en pg) liberada por  $5 \times 10^4$  células (n=3 experimentos independientes en duplicado; \* $P \leq 0.05$ ).

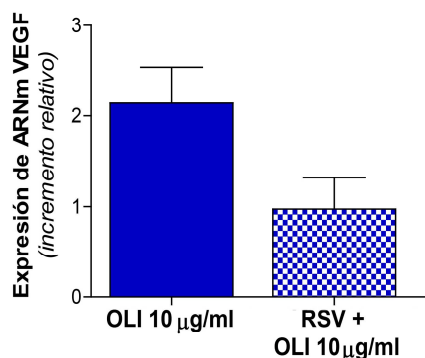
#### **7.4. Efecto del RSV sobre la expresión de VEGF y la inducción de la formación de tubos mediada por sinoviocitos con disfunción mitocondrial**

El RSV ha demostrado ser capaz de atenuar los efectos de la disfunción mitocondrial a distintos niveles. En concreto, ha mostrado una capacidad antioxidante en los sinoviocitos. Estas propiedades del RSV también podrían frenar la respuesta angiogénica de los sinoviocitos.

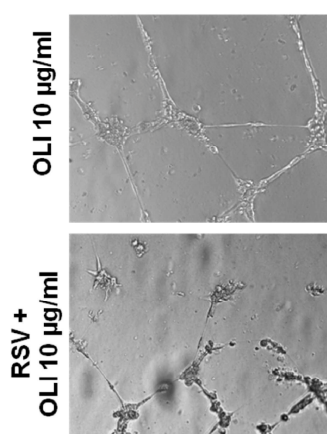
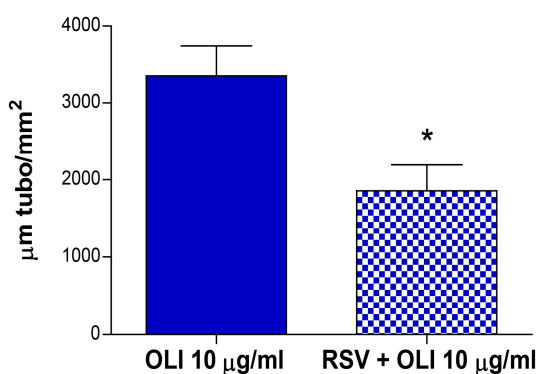
Para comprobarlo, se determinó en primer lugar la expresión génica de VEGF en sinoviocitos con disfunción mitocondrial previamente tratados o no con RSV. Se observó que el RSV es capaz de disminuir la expresión de VEGF inducida por OLI en sinoviocitos humanos normales en cultivo en más de un 50% (Figura 61A).

La capacidad de formación de tubos endoteliales se vio asimismo reducida cuando se utilizaron sobrenadantes de sinoviocitos que habían sido preincubados con RSV antes de la inducción de disfunción mitocondrial con OLI (Figura 61B-C).



**A**

**Figura 61. Modulación de los efectos angiogénicos de la disfunción mitocondrial mediante RSV. A.** La expresión de ARNm de VEGF se determinó en sinoviocitos expuestos a OLI 10 µg/ml durante 24 h preincubados o no con RSV (50 µM) durante 30 min. Los resultados se expresan como veces de incremento relativo a la condición basal (n=3). **B.** Imágenes representativas que muestran la formación de tubos inducida por los sobrenadantes de sinoviocitos tratados con OLI durante 24 h preincubados o no con RSV (50 µM) durante 30 min. **C.** Cuantificación de la formación de tubos bajo las condiciones descritas en el anterior punto. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM de la longitud total de tubos formados (en µm) por mm<sup>2</sup> de n=3 experimentos realizados por duplicado (\* $P \leq 0.05$ ).

**B****C**

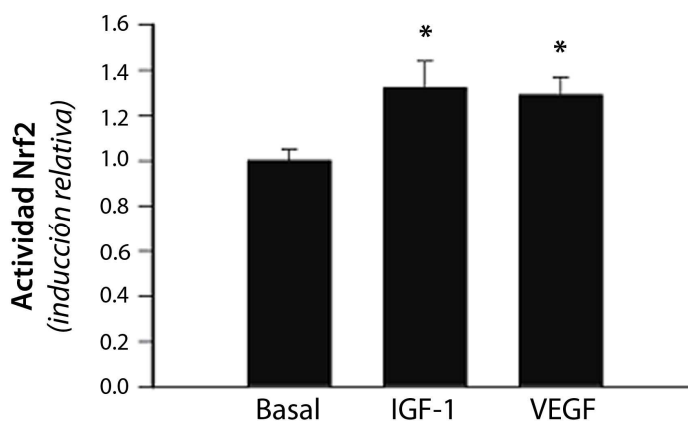
Los resultados obtenidos con RSV en este apartado muestran que este compuesto puede prevenir la respuesta patológica inducida en sinoviocitos por la disfunción mitocondrial. En concreto, se ha demostrado que RSV es capaz de reducir significativamente la generación de ROS; la activación de NF- $\kappa$ B y la liberación de los mediadores inflamatorios COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8; así como la expresión de VEGF y la capacidad de inducción de formación de tubos en células endoteliales.

## B. Papel de Nrf2 en la capacidad angiogénica de células endoteliales de arteria coronaria humanas

En este segundo bloque del estudio, se ha determinado en primer lugar la relación de los factores VEGF e IGF-1 con la modulación de la actividad transcripcional de Nrf2. A continuación, se han evaluado los efectos de la disfunción de Nrf2 en las propiedades que definen la capacidad angiogénica de las células endoteliales, así como en la sensibilidad de estas células a la apoptosis.

### 1. EFECTO DE VEGF E IGF-1 SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE NRF2 EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA CORONARIA HUMANAS EN CULTIVO

En primer lugar, se determinó el efecto de los factores proangiogénicos VEGF e IGF-1 en la actividad transcripcional de Nrf2 en células endoteliales humanas de arteria coronaria mediante ensayo de gen reportero. Para ello, las células endoteliales fueron transfectadas con la construcción de luciferasa de luciérnaga dirigida a Nrf2 y la construcción control de luciferasa de *Renilla*. Tras la estimulación con VEGF o IGF-1 durante 3 h se observó un incremento significativo en el ratio de actividad de la luciferasa de luciérnaga (normalizada frente a la actividad de la luciferasa de *Renilla*) respecto a la condición no tratada con ningún factor proangiogénico (Figura 62). El aumento de actividad de la luciferasa de luciérnaga es indicativo de un aumento proporcional de la actividad transcripcional de Nrf2 en células endoteliales estimuladas con VEGF o IGF-1.



**Figura 62: Actividad transcripcional de Nrf2 en células endoteliales humanas tratadas con IGF-1 o VEGF.** El efecto de la estimulación durante 3 h con los factores proangiogénicos IGF-1 (500 ng/ml) o VEGF (100 ng/ml) en la actividad transcripcional de Nrf2 se determinó mediante un ensayo dual de luciferasa. La actividad de la luciferasa de luciérnaga fue normalizada con la actividad de la luciferasa de *Renilla*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM del ratio de actividad respecto a la condición basal (n=5; \* $P$ <0.05 vs. basal).

Así, en este primer apartado del segundo bloque de Resultados, se confirma la capacidad de los factores IGF-1 y VEGF para inducir la actividad transcripcional de Nrf2 en células endoteliales de arteria coronaria.

## **2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE NRF2 EN LA CAPACIDAD ANGIOGÉNICA DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA ARTERIA CORONARIA HUMANAS**

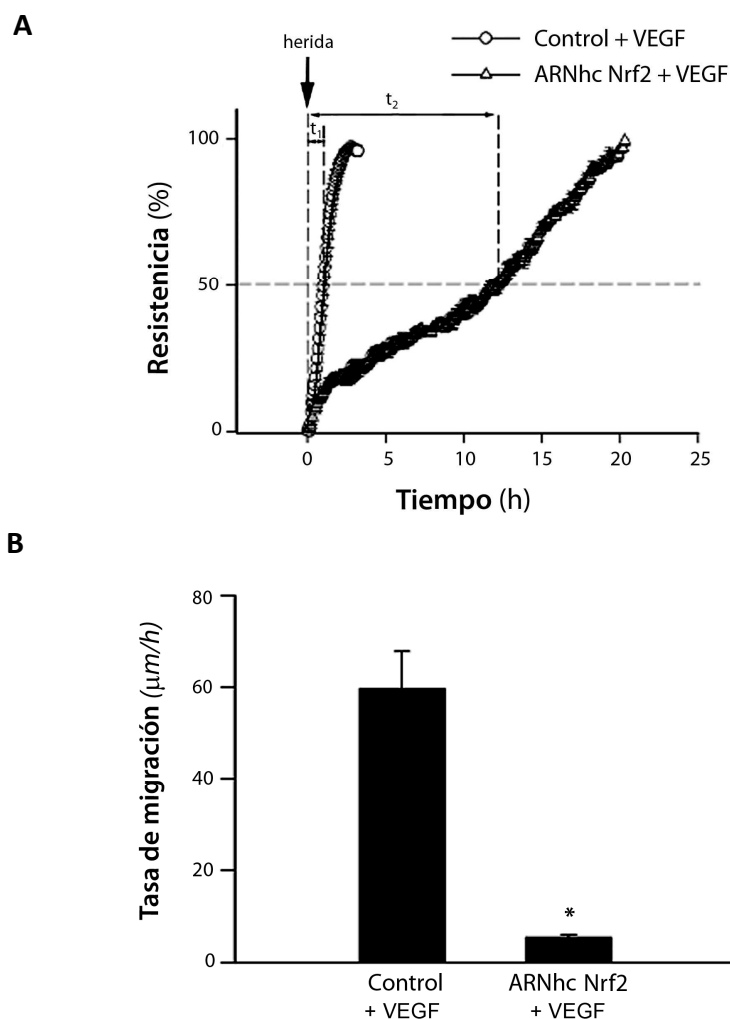
Ya que los resultados anteriores parecen mostrar que Nrf2 está involucrado en el proceso de transducción de señales de los factores angiogénicos, se determinó el efecto de la disfunción de Nrf2 sobre la capacidad angiogénica de las células endoteliales humanas. Para ello, se analizaron distintas propiedades del proceso de angiogénesis (migración, proliferación, adhesión y formación de tubos).

### **2.1. Efecto de la inhibición de Nrf2 en la capacidad de migración de las células endoteliales**

La capacidad de migración de las células endoteliales hacia el foco del estímulo proangiogénico juega un papel esencial en el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. Para investigar el efecto de la inhibición de la señalización Nrf2 en la capacidad migratoria de las células endoteliales se llevó a cabo un ensayo de “cierre de herida” basado en la tecnología ECIS.

Para llevar a cabo este ensayo, las células endoteliales transfectadas con ARNhc de Nrf2 o con el vector control, y confluentes en cada pocillo de placa ECIS 8W1E, fueron sometidas a un campo eléctrico elevado que provocó la muerte y desprendimiento de aquellas células situadas sobre el electrodo activo. En este momento se añadió el factor proangiogénico VEGF y se comenzó a registrar el aumento de la resistencia en los electrodos a medida que las células circundantes ocupaban el espacio vacío.

Los datos obtenidos demostraron que la inhibición de la señalización Nrf2 deteriora dramáticamente la capacidad de migración de las células endoteliales, ya que las células transfectadas con el ARNhc de Nrf2 necesitan un tiempo significativamente mayor para alcanzar el 50% de la máxima confluencia (Figura 63A). Así, conociendo el tamaño del electrodo activo (250  $\mu\text{m}$  de diámetro) y el tiempo que necesitaron las células para volver a cubrir la “herida”, se calculó la tasa de migración para cada condición. La Figura 63B muestra la disminución significativa en la tasa de migración de las células con Nrf2 silenciado respecto a las células control.



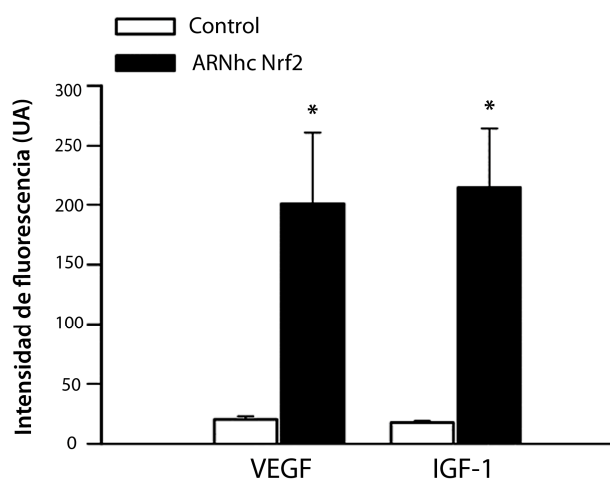
**Figura 63: Cuantificación de la capacidad de migración de células endoteliales con silenciamiento de Nrf2.** **A.** En el sistema ECIS se monitorizó la recuperación de la resistencia a lo largo del tiempo: desde la aplicación del campo eléctrico (5 mA durante 20 s a 60 kHz) hasta llegar al 100% de la resistencia, que corresponde al nivel de resistencia existente antes de la aplicación del pulso. La resistencia (a 4000 Hz) se registró cada 160 s en cada condición. En la gráfica se observa la diferencia en el tiempo empleado para llegar al 50% de la resistencia en el caso de las células control ( $t_1$ ) y de las células con ARNhc de Nrf2 ( $t_2$ ). Los datos representan la media  $\pm$  EEM de  $n=6$  experimentos independientes. **B.** La gráfica muestra la tasa de migración de las células de cada condición. La tasa de migración (en  $\mu\text{m/h}$ ) se puede calcular conociendo las dimensiones del electrodo (radio de 125  $\mu\text{m}$ ) y los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de la tasa de migración ( $n=6$ ; \* $P<0.05$  vs. control).

## 2.2. Efecto de la inhibición de Nrf2 en la capacidad de proliferación de las células endoteliales

La formación de nuevos vasos sanguíneos requiere nuevas células endoteliales para su formación. A diferencia de la vasculogénesis, que parte de células precursoras (angioblastos), la

angiogénesis parte de vasos ya formados, de manera que son las células endoteliales de los vasos preexistentes las que deben proliferar para dar lugar a nuevas células endoteliales que formen el nuevo vaso. Por ello, la capacidad de proliferación de las células endoteliales es clave en el proceso de angiogénesis.

Para evaluar la implicación de Nrf2 en la capacidad proliferativa de células endoteliales tras la incubación con VEGF o IGF-1 durante 24 h se compararon células control con células sometidas a silenciamiento de Nrf2. Los resultados mostraron que las células endoteliales con inhibición de la señalización Nrf2 presentan una fluorescencia de CFDA-SE significativamente mayor que las células endoteliales control, lo que indica que la capacidad de proliferación se ve significativamente disminuida por el silenciamiento de Nrf2 (Figura 64).



**Figura 64: Capacidad proliferativa inducida por VEGF e IGF-1 de células endoteliales con silenciamiento de Nrf2.** Mediante citometría de flujo, se determinó la intensidad de fluorescencia del CFSE-DA en células endoteliales control o con ARNhc de Nrf2 bajo estimulación con VEGF (100 ng/ml) o IGF-1 (500 ng/ml) durante 24 h. Existe una correlación inversa entre la intensidad de fluorescencia y la capacidad de proliferación. Los datos son la media  $\pm$  EEM de la intensidad de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias (UA) (n=6; \*P<0.05 vs. control).

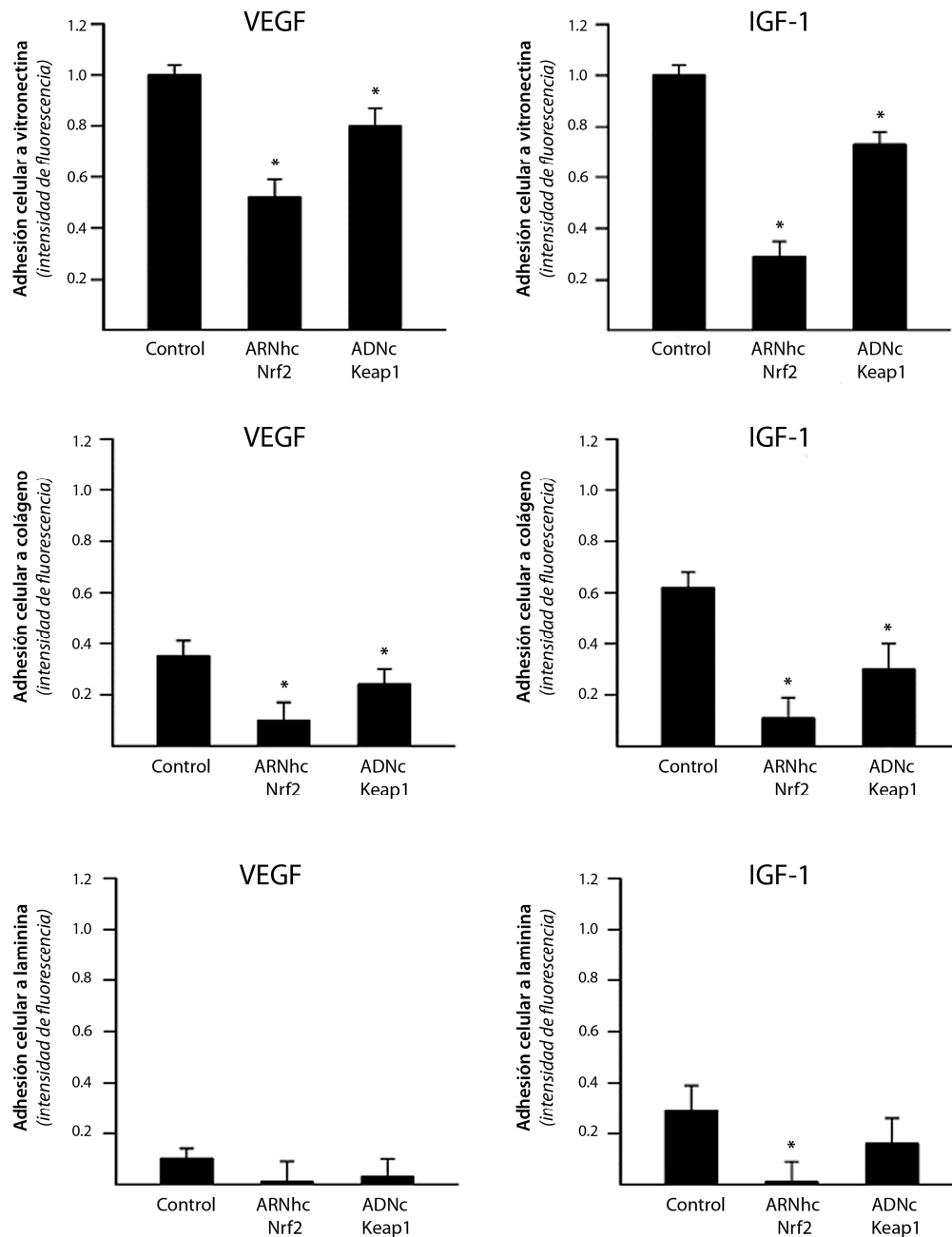
### 2.3. Efecto de la inhibición de Nrf2 en la capacidad de adhesión de las células endoteliales

Las células endoteliales que forman el nuevo vaso necesitan adherirse a la matriz extracelular, que constituye su soporte estructural. La interacción con la matriz extracelular constituye un paso requerido para la maduración del nuevo vaso.

Para comprobar si la inhibición de la señalización de Nrf2 afecta a la capacidad de adhesión de las células endoteliales a las proteínas de la matriz extracelular se realizaron dos aproximaciones metodológicas diferentes.

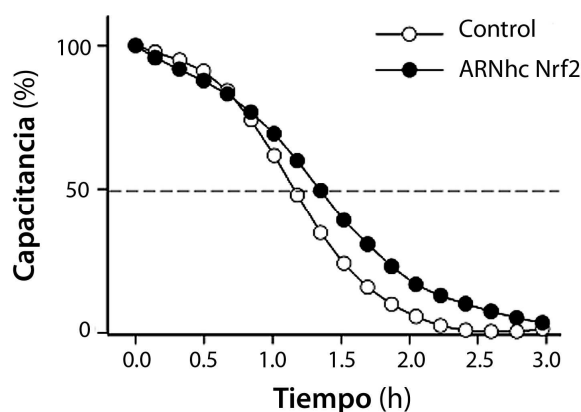
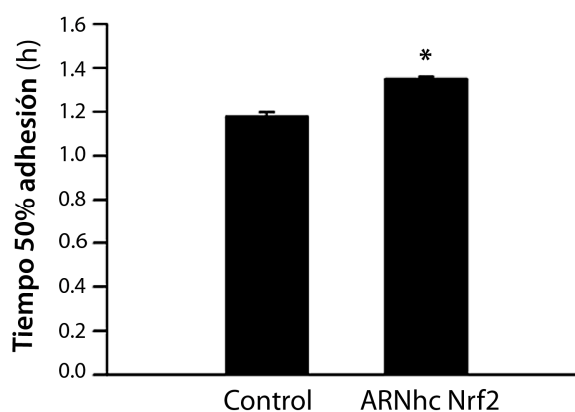
En primer lugar, se determinó la adhesión a diferentes compuestos de la matriz extracelular (vitronectina, colágeno y laminina) de las células endoteliales con inhibición de la ruta Nrf2. Se comprobó que tanto el silenciamiento de Nrf2 con ARNhc como la sobreexpresión de Keap1 (su represor citoplasmático) con ADNc afectaron negativamente a la capacidad de adhesión de las células endoteliales a las proteínas de matriz estudiadas (Figura 65).

Por otra parte, se determinó el tiempo necesario para que las células endoteliales control o con silenciamiento de Nrf2 se adhiriesen a pocillos revestidos con colágeno. Para ello, se registró la disminución de la capacitancia en las placas ECIS 8W1E desde el momento en que se sembraron en ellas las células a estudio (100%) y hasta llegar al punto de estabilización (0%) (Figura 66A). En la Figura 66B se puede observar cómo las células transfectadas con el ARNhc de Nrf2 necesitan un tiempo significativamente mayor que las células control para alcanzar el 50% de la adhesión al pocillo (50% de capacitancia).



**Figura 65: Capacidad de adhesión a proteínas de la matriz extracelular inducida por VEGF e IGF-1 de células endoteliales con disfunción de Nrf2.** Las células transfectadas con ARNhc de Nrf2, ADNc de Keap1 o vector control se sembraron en placas de 96 pocillos revestidos con vitronectina (arriba), colágeno (medio) o laminina (abajo) y se estimularon con VEGF 100 ng/ml (izquierda) o IGF-1 500 ng/ml (derecha) durante 3 h. Para cada conjunto de resultados (VEGF e IGF) se tomó como valor de referencia (intensidad de fluorescencia = 1) el valor de la condición control de adhesión a vitronectina. Los datos son la media  $\pm$  EEM de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias ( $n=4-6$ ; \* $P<0.05$  vs. control)



**A****B**

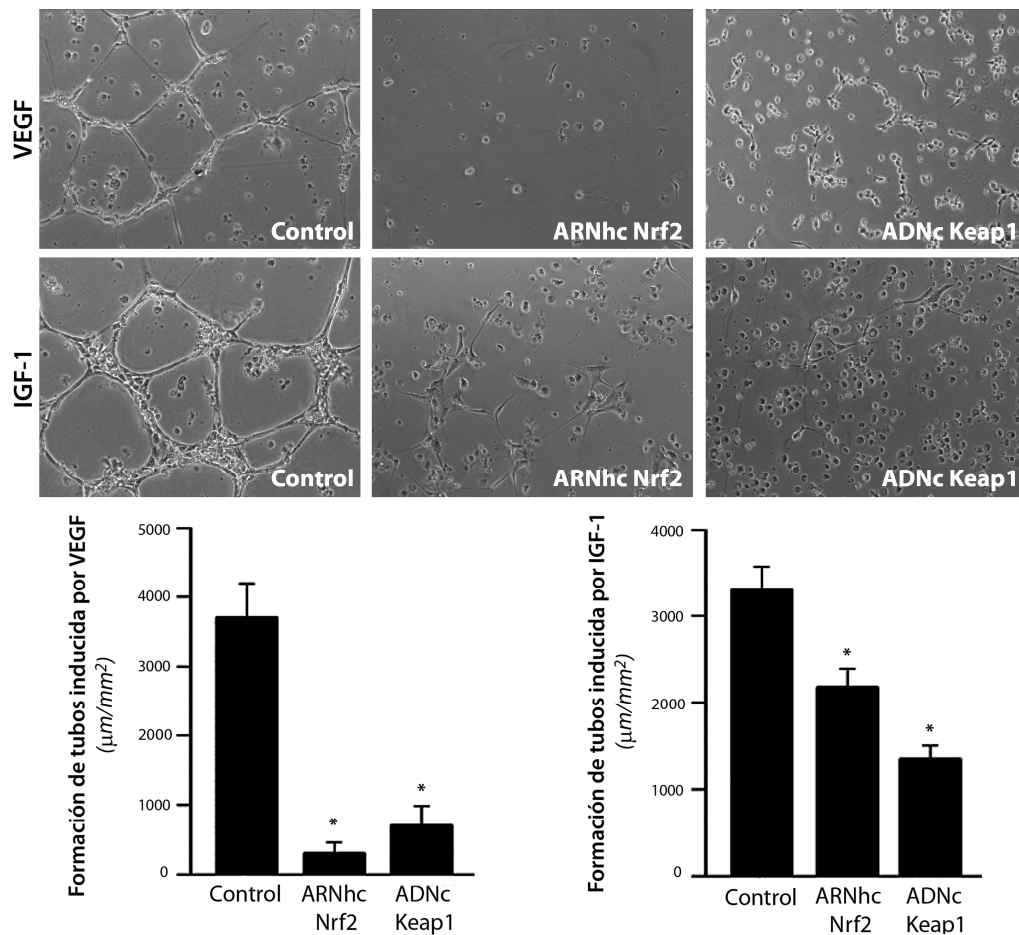
**Figura 66: Tiempo de adhesión a colágeno inducida por VEGF de células endoteliales con disfunción de Nrf2.** Las células transfectadas con ARNhc de Nrf2 o vector control se sembraron en placas ECIS revestidas con colágeno y se estimularon con VEGF. **A.** Gráfica temporal de la evolución de la capacitancia (inversamente proporcional a la adhesión celular) desde el momento en que se siembran las células hasta las 3 h, de las células control (línea con círculos blancos) y las células con silenciamiento de Nrf2 (líneas con círculos negros). **B.** La gráfica muestra la media  $\pm$  EEM del tiempo (en h) necesario para conseguir el 50% de capacitancia (o 50% de adhesión) en cada grupo experimental (n=6; \* $P < 0.05$  vs. control).

#### 2.4. Efecto de la inhibición de Nrf2 en la capacidad de formación de tubos de las células endoteliales

Las células endoteliales son capaces de formar estructuras tridimensionales de tipo vascular (tubos) cuando se encuentran embebidas en una matriz. Esta capacidad conforma una buena medida de la capacidad angiogénica de las células.

Por ello, se analizó la capacidad de formación de tubos en matrices tridimensionales de colágeno de las células endoteliales con inhibición de la ruta Nrf2 (por silenciamiento de Nrf2 o

sobreexpresión de Keap1) frente a las células endoteliales control. Los resultados mostraron que mientras que las células control son capaces de formar redes capilares elaboradas en presencia de VEGF o IGF-1, las células que presentan inhibición de la señalización Nrf2 sufren una disminución significativa de su capacidad de formación de tubos (Figura 67).



**Figura 67: Formación de tubos inducida por VEGF e IGF-1 en células endoteliales con disfunción de Nrf2.** Las células control o con silenciamiento de Nrf2 o sobreexpresión de Keap1 se sembraron sobre *Matrigel* y se estimularon con VEGF 100 ng/ml o IGF-1 500 ng/ml durante 24 h. **A.** Imágenes representativas de las estructuras tubulares formadas en células control, transfectadas con ARNhc de Nrf2 o con ADNc de Keap1 y estimuladas con VEGF o IGF-1. **B.** Las gráficas muestran la media  $\pm$  EEM de la longitud de estructuras tubulares encontradas por área en cada condición experimental (en  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ ) cuando se estimularon con VEGF (izquierda) o con IGF-1 (derecha) (n=4 por triplicado; \*P<0.05 vs. control).

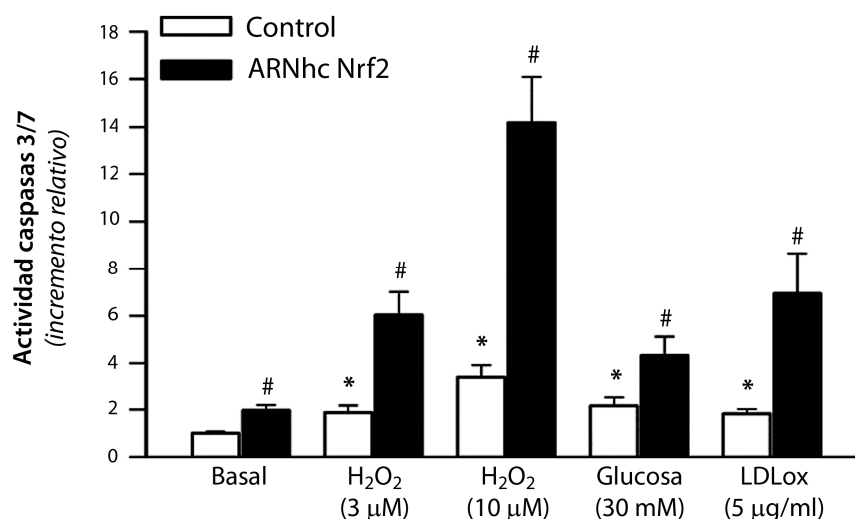
En conjunto, los resultados de este apartado demuestran que la inhibición de la señalización de Nrf2 compromete la capacidad angiogénica de las células endoteliales de arteria coronaria humanas, al reducir la capacidad de migración, proliferación, adhesión y formación de tubos de éstas.

### **3. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE NRF2 EN LA SENSIBILIDAD A LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA ARTERIA CORONARIA HUMANAS**

La sensibilidad de las células endoteliales a la apoptosis ante un estrés es uno de los factores que condiciona la capacidad angiogénica, de manera que una alta sensibilidad a la apoptosis contribuye a una capacidad angiogénica reducida, y además contribuye al proceso de rarefacción observado en ciertos tejidos con el envejecimiento.

En este trabajo se ha investigado si el silenciamiento de Nrf2 afecta a la supervivencia celular bajo condiciones basales o bajo el tratamiento con estímulos proapoptóticos: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, altas concentraciones de glucosa y LDLox. Para evaluar el grado de supervivencia o apoptosis, se midió la actividad de las caspasas 3/7.

Los resultados han mostrado que las células endoteliales con silenciamiento de Nrf2 muestran una actividad de caspasas 3/7 significativamente mayor que las células control. Además, el silenciamiento de Nrf2 provocó una sensibilización de las células a los estímulos proapoptóticos, de manera que la actividad de las caspasas 3/7 inducida por todos los estímulos empleados es significativamente mayor en células con silenciamiento de Nrf2 que en células control bajo el mismo estímulo (Figura 68).



**Figura 68: Actividad de las caspasas 3/7 en células endoteliales con silenciamiento de Nrf2 en condiciones basales o tratadas con estímulos apoptóticos.** Se evaluó la actividad de las caspasas 3/7 como medida de muerte celular en células control o con ARNhc de Nrf2. Las células de ambos grupos experimentales se sometieron a condiciones basales o proapoptóticas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, altas concentraciones de glucosa o LDL oxidado) durante 18 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM de la intensidad de fluorescencia relativa a la condición basal de las células control (n=6; \* $P$ <0.05 vs. basal de las células control; #  $P$ <0.05 vs. células control del respectivo tratamiento).

Por tanto, se demuestra en este último apartado que la disfunción de la señalización Nrf2 provoca una sensibilización de las células endoteliales a la apoptosis.



## DISCUSIÓN





## **A. Estudio del efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria del sinoviocito humano normal en cultivo**

Los resultados presentados en este bloque han permitido identificar a la mitocondria como un elemento importante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y angiogénica en sinoviocitos humanos normales en cultivo.

En este trabajo se ha demostrado que una disfunción mitocondrial en los sinoviocitos induce una leve respuesta inflamatoria en estas células, produciendo la liberación de PGE<sub>2</sub> e IL-8. De especial relevancia resulta el hecho de que los sinoviocitos que sufren disfunción mitocondrial responden a la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  con mayor intensidad en cuanto a la inducción de la respuesta inflamatoria. Es decir, que la disfunción mitocondrial provoca que los sinoviocitos sean más sensibles a las citoquinas proinflamatorias presentes en su ambiente. En cuanto a los mediadores implicados en la ruta de transducción de señales que llevan a la respuesta inflamatoria descrita, se ha confirmado la participación de ROS y del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. AP-1 también podría estar contribuyendo a la expresión inflamatoria, ya que se encuentra activado en células con disfunción mitocondrial tanto en presencia como en ausencia de IL-1 $\beta$ . Por su parte, la activación de caspasas es otro factor que podría estar involucrado en el desarrollo de la respuesta inflamatoria inducida por disfunción mitocondrial en los sinoviocitos. En este sentido, es probable que el inflamasoma, por medio de la activación de la caspasa-1, desempeñe un papel importante en esta ruta.

Además de mediante la liberación de mediadores inflamatorios, la disfunción mitocondrial también puede participar en la respuesta inflamatoria provocando el desencadenamiento del proceso angiogénico. Así, en este trabajo se ha demostrado que sinoviocitos que presentan daño mitocondrial liberan una mayor cantidad de VEGF y otros factores que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Por último, se ha demostrado que el tratamiento con RSV es capaz de controlar la respuesta inflamatoria y angiogénica inducida por la disfunción mitocondrial en sinoviocitos humanos en cultivo.

Teniendo en cuenta la implicación del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en AR, estos resultados pueden ser de gran relevancia fisiológica y contribuir a la comprensión de su patofisiología.

La AR es una enfermedad compleja, cuya etiología no ha sido completamente elucidada todavía aunque se sabe que ésta presenta un componente genético, un componente ambiental y un componente hormonal que justifica su mayor incidencia en mujeres. Además diversos estudios han aportado información sobre la implicación del daño mitocondrial y el estrés oxidativo en la patología de la AR. Así, se ha determinado que el ADNmt de los sinoviocitos de pacientes AR presenta una mayor tasa de mutagénesis y estrés oxidativo y se ha detectado disfunción mitocondrial en sinoviocitos artríticos así como en linfocitos periféricos de pacientes AR (75-79). Los niveles de estrés oxidativo resultantes se relacionan con el grado de inflamación del tejido y, por tanto, de actividad de la enfermedad (81, 82). Si el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial son causa o consecuencia de la enfermedad todavía constituye una incógnita (154).

Para reproducir en sinoviocitos normales el daño mitocondrial que ocurre en los sinoviocitos AR y poder estudiar así su efecto, en este trabajo se realizó un modelo *in vitro* de disfunción mitocondrial en sinoviocitos inducido por OLI, un inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial. Los inhibidores químicos de los diferentes complejos mitocondriales que participan en la fosforilación oxidativa han sido ampliamente utilizados para simular patologías relacionadas con la mitocondria, o provocar alguna de sus características, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, rotenona (un inhibidor del complejo I de la CRM) o AA (inhibidor del complejo III) reproducen los efectos de enfermedades especialmente degenerativas, como Alzheimer o Parkinson, mientras que OLI ha mostrado reproducir los efectos de la uremia (155-157).

En el presente estudio se comprobó, en primer lugar, que efectivamente OLI induce una disfunción mitocondrial en los sinoviocitos en cultivo. La inducción de la disfunción se evaluó mediante la valoración de distintos aspectos de la función mitocondrial. En concreto, se observó una disminución dosis-dependiente del potencial de membrana mitocondrial, así como una disminución de un 18% en la producción de ATP celular. Además, OLI también ha demostrado ser capaz de disminuir hasta un 50% la tasa de consumo de oxígeno de sinoviocitos de rata Lewis (resultados no mostrados), confirmando así su poder para crear una disfunción mitocondrial.

La teoría quimiosmótica explica cómo la síntesis de ATP y la transferencia electrónica son dos procesos que, salvo excepciones, están acoplados. OLI es un antibiótico que interacciona directamente con la ATP sintasa bloqueando el flujo de retorno de los protones a la matriz mitocondrial a través del canal de la ATP sintasa. Detiene, por tanto, la síntesis de ATP mitocondrial, provocando una disminución en sus niveles. Sin embargo, la CRM continúa expulsando más protones al espacio intermembrana. Así, se genera un mayor gradiente de protones, lo que conlleva una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, y que la tasa de tasa de transporte electrónico a través de la cadena sea más lenta. Cuando se ralentiza la cadena respiratoria, más electrones se desvían de la ruta a través de los complejos, resultando en una mayor producción de ROS (158, 159). Así, la fuerza protón-motriz aumenta hasta que llega al punto en que el coste energético del bombeo de protones fuera de la matriz en contra de gradiente es igual o superior a la energía liberada por la transferencia electrónica. En este momento, el flujo de electrones se detiene y los protones son devueltos a la matriz mitocondrial a favor de gradiente a través de transportadores hasta que el gradiente desaparece y la mitocondria pasa a un estado de despolarización. Cuando existe una disminución en la actividad de la CRM, se activan mecanismos compensatorios para la síntesis de ATP, como un aumento de la tasa de glucólisis, y se produce un aumento en la producción de  $O_2^-$  mitocondrial (160). Estos resultados concuerdan con el incremento de la actividad glucolítica observada en los sinoviocitos AR, una característica de gran relevancia en su patogénesis (161). Además, la falta de ATP puede interferir con la expulsión de  $Ca^{+2}$ , siendo por tanto retenido en la mitocondria y provocando la producción de ROS (147, 162).

Cuando se determinó la producción de ROS en los sinoviocitos incubados con el inhibidor mitocondrial OLI, se comprobó que éste provocaba un incremento dosis-dependiente de la producción de  $O_2^-$  mitocondrial y citosólico (evaluado mediante microscopía óptica de fluorescencia con los fluoróforos mitoSOX red y DHE, respectivamente), que se corresponde con el aumento en la detección de  $H_2O_2$  observado por citometría de flujo con el fluoróforo DCFH.

La mayoría de los experimentos se realizaron dentro de las primeras 9 h de estimulación de los sinoviocitos, tiempos a los que no se detectaron diferencias significativas en la viabilidad celular respecto a la condición basal. Las dosis de OLI utilizadas no resultan en un incremento de

la muerte celular en los tiempos de incubación utilizados (4h, 6h y 9h), excepto por un pequeño incremento en la apoptosis con la mayor dosis de OLI empleada (25 µg/ml).

Una vez demostrada la validez del modelo de disfunción mitocondrial, y confirmado el incremento en la producción de ROS, este trabajo se ha centrado en la implicación de dicha disfunción en la respuesta inflamatoria del sinoviocito humano. Los sinoviocitos son células altamente secretoras de mediadores inflamatorios y son consideradas el principal tipo celular responsable del daño articular en las artritis inflamatorias (163). Ante estímulos proinflamatorios, estas células producen una gran variedad de citoquinas inflamatorias y moléculas efectoras, destacando por su relevancia la enzima COX-2, entre otras. El sistema COX-1/COX-2 está ampliamente involucrado en la regulación de las rutas inflamatorias en la sinovial. Como ya se ha explicado con anterioridad, COX-1 se expresa de manera constitutiva mientras que COX-2 se expresa de manera inducible en respuesta a determinados estímulos proinflamatorios, como IL-1 $\beta$  (38).

La expresión de COX-2 se encuentra incrementada en sinoviocitos de la íntima en distintos tipos de artritis inflamatorias (AR, espondilitis anquilosante o artritis psoriásica), pero también en otros tipos celulares presentes en las articulaciones afectadas por estas enfermedades, como en condrocitos, en el endotelio de los vasos sanguíneos y células de la capa subíntima de la sinovial. Esta expresión se eleva en relación al grado de infiltración de la sinovial y es significativamente mayor que en articulaciones de pacientes afectados con artrosis (164).

En este trabajo se ha demostrado que los sinoviocitos que sufren una disfunción mitocondrial presentan una expresión génica y proteica de COX-2 significativamente mayor que aquellos sinoviocitos sin disfunción. Esta expresión aumenta de manera proporcional a la dosis de OLI utilizada, es decir, al grado de disfunción mitocondrial. Por el contrario, la expresión de la isoforma constitutiva COX-1 no se vio modificada con ninguna de las dosis utilizadas. Además, se ha demostrado que el aumento de la expresión de COX-2 en sinoviocitos con disfunción mitocondrial lleva consigo un aumento proporcional en la producción de PGE<sub>2</sub>.

Por su parte, las quimioquinas son moléculas de gran importancia en la patología AR, ya que facilitan, entre otros procesos, el infiltrado de las células inflamatorias. IL-8 es una de las quimioquinas más destacadas en AR, con capacidad angiogénica y que se encuentra altamente

expresada en el tejido y el líquido sinovial de los pacientes afectados. En este estudio, cuando se indujo disfunción mitocondrial en los sinoviocitos mediante el tratamiento con OLI, la expresión de IL-8 aumentó significativamente, tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico.

Por tanto, la disfunción mitocondrial en los sinoviocitos induce la producción de COX-2 y PGE<sub>2</sub> así como la liberación de IL-8. Se trata de una estimulación de la respuesta inflamatoria de proporciones moderadas, que sin embargo puede jugar un papel importante en el deterioro celular del sinoviocito y en la creación de un ciclo de retroalimentación de estrés oxidativo.

Resultados *in vivo* encontrados en nuestro grupo, han confirmado parcialmente los resultados de este estudio *in vitro*. Así, se ha demostrado que la inyección intraarticular de OLI en rodillas de ratas Lewis induce una respuesta oxidativa en la sinovial, así como una clara respuesta inflamatoria en la articulación evidente tanto macroscópicamente (aumento del diámetro articular) como microscópicamente (aumento de la hiperplasia, infiltrado de células inflamatorias, y aumento en la expresión de IL-8 en la sinovial) (165).

Además, esta disfunción mitocondrial ejerce otro efecto de mayor relevancia fisiológica sobre el sinoviocito humano. Con el envejecimiento, y en mucha mayor medida con la aparición de enfermedades inflamatorias como la AR, los niveles de citoquinas proinflamatorias aumentan tanto en suero como en tejidos. En concreto, en el tejido sinovial la IL-1 $\beta$  es una de las citoquinas proinflamatorias más abundantes y características, que induce la producción de gran variedad de mediadores inflamatorios entre los cuales se encuentran PGE<sub>2</sub> e IL-8. IL-1 $\beta$  se encuentra en elevadas concentraciones en la membrana y líquido sinovial reumatoide, presentándose en un rango de entre 100 – 200 pg/ml (166). Además, sus niveles se correlacionan con la actividad de la enfermedad (167). En este estudio se ha demostrado que sinoviocitos con una disfunción mitocondrial presentan una respuesta inflamatoria exacerbada a IL-1 $\beta$  (utilizada en dosis similares a las encontradas en la sinovial AR) respecto a aquellos con mitocondrias sanas, actuando el tratamiento con OLI y la IL-1 $\beta$  de manera sinérgica para la producción de COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8. Así, sinoviocitos cuyas mitocondrias se encuentran dañadas pueden presentar la misma expresión génica de COX-2 en respuesta a IL-1 $\beta$  que sinoviocitos con mitocondrias sanas en respuesta a una dosis 50 veces mayor de IL-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$  0.1 ng/ml vs IL-1 $\beta$  5 ng/ml). El porcentaje de incremento de COX-2 inducido por la combinación de IL-1 $\beta$  + OLI fue indirectamente proporcional a la dosis de IL-1 $\beta$ .

Estos resultados son apoyados por estudios previos en nuestro laboratorio en los que se demuestra que la disfunción mitocondrial es capaz de incrementar la producción de COX-2 y PGE<sub>2</sub>, así como de IL-8, en condrocitos humanos normales en cultivo (138, 147). Además, la producción de estos tres mediadores en condrocitos con disfunción mitocondrial se ve igualmente exacerbada en presencia de IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$  (138).

La inflamación crónica se perpetúa y se amplifica a sí misma a través de numerosos ciclos de retroalimentación que actúan de manera autocrina y paracrina. Así, se ha demostrado, por ejemplo, que la liberación de PGE<sub>2</sub> puede contribuir a la generación de un ciclo de retroalimentación positivo que estabiliza el ARNm de COX-2 y aumenta la síntesis proteica de COX-2 en sinoviocitos a través de la activación de p38 (168). También se ha demostrado que la expresión de COX-2 y, consiguientemente, los niveles de PGE<sub>2</sub> pueden ser inducidos por el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (169, 170). El 4-HNE es un aldehído formado por la peroxidación lipídica de ácidos grasos 6-poliinsaturados por el radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Reacciona con otras moléculas como proteínas o ADN, actuando por tanto también como inductor de estrés oxidativo en la célula. Así, es capaz de provocar daño sobre proteínas mitocondriales, lo que puede agravar la disfunción mitocondrial, o sobre otras proteínas, a las que además confiere potencial inmunogénico. Por todo ello, juega un papel destacable en inflamación, correlacionándose sus niveles con la actividad de la enfermedad en pacientes con artritis inflamatorias (171).

La producción de PGE<sub>2</sub> ejerce efectos anti-anabólicos, disminuyendo la síntesis de proteoglicanos y la expresión génica del agregano. Resulta de gran interés destacar que PGE<sub>2</sub> promueve la expresión de IL-1 $\beta$  en condrocitos articulares, y que actúa de forma sinérgica con IL-1 $\beta$  en la inducción de la expresión de IL-6 y la enzima iNOS, amplificando así el proceso inflamatorio en la articulación (172). Todo ello confiere una mayor relevancia fisiológica a los resultados del presente estudio, ya que la disfunción mitocondrial desencadenará una amplificación de la respuesta inflamatoria a distintos niveles.

Es importante destacar que cuando se evaluó el efecto de otros compuestos que inducen disfunción mitocondrial, como el inhibidor del complejo III de la CRM AA o el prooxidante mitocondrial PQ, se comprobó que éstos presentan efectos similares a OLI. En concreto, inducen la respuesta inflamatoria de los sinoviocitos humanos normales y amplifican la respuesta inducida por IL-1 $\beta$ , manteniendo la viabilidad celular.

La CRM es una importante fuente de producción de ROS. Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de los sinoviocitos con el inhibidor de la ATP sintasa, OLI, induce la producción de ROS tanto citoplasmáticas como mitocondriales. Las ROS producidas, que tienen la capacidad de oxidar sustratos, actuando como segundos mensajeros, están involucrados en la señalización de la respuesta inflamatoria. Cuando los sinoviocitos se preincubaron con un antioxidante general, NAC, la producción de COX-2 inducida por la disfunción mitocondrial en presencia y en ausencia de IL-1 $\beta$  disminuyó significativamente. El antioxidante mitoTEMPO, que secuestra selectivamente las ROS de origen mitocondrial, mostró un efecto similar reduciendo la liberación de IL-8, demostrando así que una parte del efecto inflamatorio de la disfunción mitocondrial es atribuible a las ROS liberadas por la mitocondria.

La interacción entre el estrés oxidativo y la inflamación se hace patente también en otros tipos celulares. Así, la disfunción mitocondrial también ha demostrado aumentar la generación de ROS originando el incremento de mediadores inflamatorios o acumulación de células inflamatorias en las vías respiratorias, en condrocitos o en células de fibrosarcoma (138, 147, 173, 174). Además, la ruta de biosíntesis de prostaglandinas produce varias especies reactivas, lo que puede exacerbar las condiciones oxidativas, y por tanto inflamatorias, y promover el daño tisular, llevando a un ciclo que se retroalimenta y se hace cada vez más difícil de detener (175).

Como ya se ha descrito, los tejidos de las articulaciones que sufren las artritis inflamatorias están expuestos a docenas, o quizá cientos, de estímulos (inflamatorios, antiinflamatorios, proapoptóticos, antiapoptóticos, de supervivencia, quimiotácticos, angiogénicos, factores de crecimiento, etc). Sin embargo, tan sólo unos pocos factores de transcripción inducibles, como AP-1, NF- $\kappa$ B, C/EBPs (*CCAAT/enhancer binding proteins*), STATs (*signal transducers and activators of transcription*), NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*), son los responsables de la regulación de estos genes. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es uno de los más estudiados y es sensible al estado redox celular. Se trata de un factor de gran importancia en la patología inflamatoria, que juega un papel clave en la iniciación y la perpetuación de la inflamación crónica en AR. Se han encontrado más de 150 genes diana de NF- $\kappa$ B, muchos de los cuales son mediadores importantes de la patología AR (56). Entre estos genes regulados por NF- $\kappa$ B en la sinovial se encuentran COX-2 e IL-8.

Las ROS pueden activar las IKK, directamente o mediante el intermediario 4-HNE, que fosforilan el inhibidor I $\kappa$ B y ello provoca la traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B, suponiendo así un paso intermedio entre la disfunción mitocondrial y la señalización COX-2/ NF- $\kappa$ B (176).

Este factor de transcripción, debido a su gran implicación en la patología de la AR y su sensibilidad al estrés oxidativo, resulta un candidato perfecto para explicar la inducción y amplificación de la señal inflamatoria en este estudio. Por ello, se ha comprobado en primer lugar que la disfunción mitocondrial induce la activación de NF- $\kappa$ B y potencia la activación de éste inducida por IL-1 $\beta$ . Otros grupos han obtenido resultados similares, en los que se demuestra una mayor activación de NF- $\kappa$ B bajo condiciones de disfunción mitocondrial (96, 174). La técnica de EMSA permite evaluar la capacidad de unión de NF- $\kappa$ B a su secuencia consenso. Los complejos de NF- $\kappa$ B presentes en los extractos nucleares de los sinoviocitos sometidos a disfunción mitocondrial presentan generalmente una capacidad de unión a la sonda de ADN con su secuencia consenso sólo débilmente incrementada respecto a sinoviocitos sin disfunción, a pesar de la gran producción de ROS inducida por OLI. Se ha descrito que el NF- $\kappa$ B oxidado sufre una disminución en la capacidad de unión al ADN, y que ésta es restaurada en presencia de enzimas reductoras como la tioredoxina (177). Se podría argumentar, por tanto, que los sinoviocitos en cultivo con disfunción mitocondrial presentan unos niveles de ROS que oxidan al complejo NF- $\kappa$ B reduciendo su capacidad de unión al ADN. Sin embargo, en presencia de IL-1 $\beta$ , un conocido inductor de tioredoxina, la unión al ADN se restaura, mostrando así una mayor señal en el EMSA.

Mediante el uso del inhibidor de NF- $\kappa$ B, BAY, se confirmó que esta activación de NF- $\kappa$ B inducida por la disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ , es responsable de la inducción de la respuesta inflamatoria. NF- $\kappa$ B, por tanto, sería un factor de transcripción esencial para el desarrollo de la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial en sinoviocitos humanos.

NF- $\kappa$ B es un factor crítico en múltiples procesos y, como tal, debe estar sujeto a una estrecha regulación, que implica modificaciones post-transcripcionales de las proteínas de NF- $\kappa$ B, así como la intervención de diversos co-activadores o co-represores; y también debe estar coordinado con otros sistemas de señalización como AP-1 o HIF-1, con los que puede establecer una regulación mutua (64, 178). De hecho, en este trabajo se ha demostrado que la disfunción



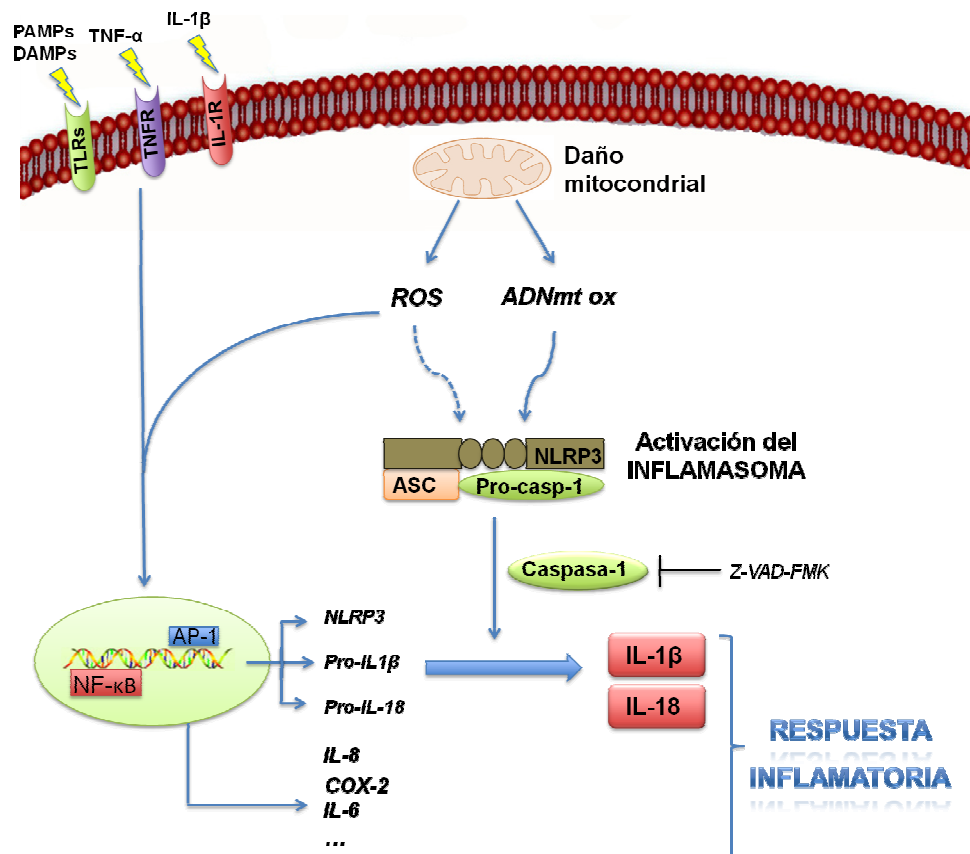
mitocondrial puede modular también la actividad de los factores de transcripción AP-1 e HIF-1 en presencia o no de IL-1 $\beta$ . La activación de estos factores puede contribuir también a la inducción y amplificación de la respuesta inflamatoria, constituyendo una posible explicación al efecto sinérgico encontrado en la respuesta inflamatoria inducida por IL-1 $\beta$  en células con disfunción mitocondrial.

Por su parte, el factor de transcripción Nrf2 juega un papel importante en el intento de contrarrestar el estrés oxidativo en las células. En este sentido, Nrf2 induce la expresión de enzimas detoxificantes de fase II como HO-1, NQO1 o GCL en las células sometidas a estrés oxidativo. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que Nrf2 se encuentra activado en los sinoviocitos humanos a los que se le ha inducido disfunción mitocondrial con OLI. Se trata de un resultado esperable ya que, como se ha comentado anteriormente, la activación de Nrf2 constituye la principal defensa antioxidante de la célula. Sin embargo, esta activación parece no ser suficiente para hacer frente a la carga oxidativa y a la activación de factores proinflamatorios provocada por la disfunción mitocondrial. Así, otros estudios han encontrado una mayor activación de Nrf2 y mayores niveles de sus enzimas relacionadas en pacientes AR (68, 69). Se observa, por tanto, que la respuesta inflamatoria tiene lugar a pesar del incremento de la actividad transcripcional de Nrf2. Sin embargo, es importante destacar que juega un importante papel protector ya que la ausencia de este factor en ratones *knockout* provocó una mayor severidad de la artritis induciendo una mayor inducción de mediadores inflamatorios en la sinovial, angiogénesis y destrucción de cartílago articular (68, 70). Como se ha comentado anteriormente, la actividad de este factor protector se ve deteriorada durante el envejecimiento, lo que podría contribuir al empeoramiento de la enfermedad AR en edades avanzadas.

Un posible mecanismo que puede explicar el fenómeno sinérgico entre la disfunción mitocondrial y la IL-1 $\beta$  es la activación del inflammasoma. Como se ha comentado previamente, la proteína NLRP3 (*NOD-like receptor-related protein 3*) es un receptor citosólico que actúa como un sensor de señales de estrés (DAMPs), incluyendo proteínas oxidadas o señales de daño mitocondrial (como ADNmt o péptidos formilados). Además, se ha demostrado que la generación mitocondrial de ROS es necesaria para la activación de NLRP3 (179, 180). Así, la disfunción mitocondrial, a través de la incrementada producción de ROS, conduciría a la

formación del NLRP3 inflamasoma y, en consecuencia, a la activación de la caspasa-1, que es la encargada de la escisión de la pro-IL-1 $\beta$ . Las rutas de NF- $\kappa$ B y NLRP3 inflamasoma pueden actuar conjuntamente activando citoquinas inflamatorias, lo que lleva a una sobreestimulación de la respuesta inflamatoria (181-183).

Es probable que este mecanismo participe en la amplificación de la respuesta inflamatoria observada en los sinoviocitos humanos con disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ . Mediante la unión al receptor IL-1R, la IL-1 $\beta$  presente en el medio induciría la activación de NF- $\kappa$ B y/o AP-1, un primer paso necesario (comúnmente denominado *priming* o cebado) que resulta en la transcripción de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18. Por su parte, ROS mitocondriales, además de inducir la activación de los factores de transcripción sensibles al estado redox, también induciría (mediante mecanismos todavía desconocidos) la formación y activación del inflamasoma. Ello conduce a la maduración de la caspasa-1, que a su vez escindiría las pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 para convertirlas en sus formas activas, de manera que son liberadas para retroalimentar el ciclo de señalización y amplificar la respuesta inflamatoria (Figura 69). Así, cuando se inhibió la activación de la caspasa-1 con el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK en sinoviocitos con disfunción mitocondrial en presencia de IL-1 $\beta$ , la liberación de mediadores inflamatorios se redujo, indicando que las caspasas, y presumiblemente la caspasa-1, podrían estar involucradas en la respuesta inflamatoria. De hecho, se ha descrito una activación de la caspasa-1 desde las fases tempranas de la AR (184). Por todo ello, la implicación del inflamasoma en la patogénesis de la AR constituye una posibilidad que merece mayor estudio. También se ha propuesto la participación del inflamasoma en diversas enfermedades relacionadas con disfunción mitocondrial e inflamación, como en la enfermedad de Crohn, Parkinson, Alzheimer o diabetes tipo 2 (185, 186).



**Figura 69: Posible vía de amplificación de la respuesta inflamatoria en sinoviocitos con disfunción mitocondrial mediante la activación del inflamasoma.** La unión de la citoquina IL-1 $\beta$  a su receptor induce una cascada de señalización que culmina con la activación de NF- $\kappa$ B y/o AP-1 y la transcripción génica de mediadores inflamatorios como IL-8 y COX-2 y las formas inmaduras pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18. Estas últimas citoquinas se convierten en las formas maduras al sufrir la escisión proteolítica mediada por caspasa-1. Por su parte, la caspasa-1 sufre la maduración proteolítica desde la forma de pro-caspasa-1 cuando se activa el inflamasoma. El inflamasoma se activa en respuesta a multitud de estímulos, entre los que se encuentran señales derivadas del daño mitocondrial. En sinoviocitos con disfunción mitocondrial, la liberación de ROS sería capaz de inducir la activación del inflamasoma, así como de contribuir a la activación de los factores de transcripción sensibles al estado redox NF- $\kappa$ B y AP-1. La maduración de la citoquina IL-1 $\beta$  y su secreción propiciada por la activación del inflamasoma sería responsable de la amplificación de la señal inflamatoria, induciendo también la transcripción de NLRP3 para aumentar sus niveles. El tratamiento de los sinoviocitos con un inhibidor de las caspasas, Z-VAD-FMK, interrumpiría la señalización reduciendo la respuesta inflamatoria.

Un hecho de vital importancia a la hora de evaluar la respuesta inflamatoria en la sinovial artrítica es el estado hipóxico del tejido. Las articulaciones afectadas por artritis inflamatorias presentan un ambiente hipóxico resultado de una alta demanda metabólica por el incremento de la celularidad y una insuficiente irrigación sanguínea que proporcione oxígeno al tejido. A pesar de que en la sinovial ocurre un proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos estimulado por la gran variedad de quimioquinas y factores de crecimiento secretados, la elevada presión intraarticular existente puede llegar a superar a la presión de cierre de los capilares, produciendo un colapso que impide el suministro de oxígeno al tejido de manera intermitente (187). Otros factores, como una angiogénesis no funcional (formación de vasos inmaduros), contribuyen a la falta de oxígeno en la sinovial. En este sentido, es importante destacar que el grado de hipoxia de la sinovial AR se correlaciona con la actividad de la enfermedad y la disfunción mitocondrial (77). Así, en los períodos de mayor actividad de la enfermedad, cuando la hipoxia es más pronunciada en la articulación, el grado de mutagénesis mitocondrial en la sinovial se incrementa significativamente. Además, se ha demostrado que HIF-1 (que, como se ha comentado anteriormente, se activa en condiciones de hipoxia) contribuye al aumento del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial al inducir un incremento en la actividad enzimática de iNOS, lo que da lugar a una elevada producción de NO que, a su vez, inhibe la función mitocondrial de los sinoviocitos humanos (80, 188). Además, durante períodos de hipoxia, HIF puede influir en la función mitocondrial mediante la supresión del ciclo de Krebs y de la respiración, ya que desvía la producción de ATP hacia la vía glucolítica, que se ve intensamente incrementada (189, 190).

Por tanto, es posible que la hipoxia sea la causa o, al menos, una de las causas de la disfunción mitocondrial en los sinoviocitos AR. En este sentido, se ha encontrado que la hipoxia en la sinovial AR potencia la respuesta inflamatoria en sinoviocitos, aumentando la expresión de COX-2 y PGE<sub>2</sub> y la liberación de MMPs en respuesta a IL-1 $\beta$  (191). Este dato concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, en los que la disfunción mitocondrial induce la expresión de mediadores inflamatorios en sinoviocitos humanos expuestos a IL-1 $\beta$ , apoyando la teoría de que los sinoviocitos con disfunción mitocondrial presentan una respuesta inflamatoria de mayores proporciones a IL-1 $\beta$ .

Por su parte, la liberación de  $\text{PGE}_2$  inducida por disfunción mitocondrial a través de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  induce el incremento de  $\text{HIF-1}\alpha$ , lo que relaciona la actividad transcripcional de estos dos factores (192). Así, se crearía un ciclo de retroalimentación positiva, en el que la hipoxia induce disfunción mitocondrial a través de  $\text{HIF-1}$ ; y la disfunción mitocondrial induce la activación de  $\text{HIF-1}$ , bien directamente o a través de los mediadores inflamatorios ( $\text{PGE}_2$ ) inducidos por  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ .

De hecho, en este estudio, se ha observado que la disfunción mitocondrial induce la activación de  $\text{HIF-1}$  en sinoviocitos humanos. Uno de los principales genes inducidos por medio de la activación de  $\text{HIF-1}$  es VEGF, un importante factor angiogénico que juega un papel clave en la patología AR. Así, se ha encontrado una elevada concentración de VEGF en el suero y en el líquido y la membrana sinovial de pacientes AR en comparación con pacientes con artrosis o personas sanas (92). Además, las citoquinas más abundantes en la sinovial AR, como  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  o  $\text{TGF-}\beta$ , inducen la expresión de VEGF en sinoviocitos humanos (7). En nuestro estudio, cuando se ha estudiado la expresión génica de VEGF en sinoviocitos con disfunción mitocondrial inducida por OLI se ha encontrado un incremento dosis-dependiente, hasta niveles iguales o superiores a los inducidos por  $\text{IL-1}\beta$ . Sin embargo, al igual que los resultados obtenidos con  $\text{HIF-1}$ , no se ha encontrado, respecto a la expresión de VEGF, un efecto sinérgico de la disfunción mitocondrial en presencia de  $\text{IL-1}\beta$ . Los ensayos funcionales confirmaron que los sinoviocitos con disfunción mitocondrial secretan mediadores angiogénicos al medio que son capaces de inducir la formación de tubos en células endoteliales. En concreto, mediante ensayos de neutralización, se identificaron VEGF e  $\text{IL-8}$  como mediadores implicados en la inducción de formación de tubos, confirmando la capacidad de la disfunción mitocondrial para inducir angiogénesis activando  $\text{HIF-1}$  y/o  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Otros estudios también han demostrado que el daño oxidativo en células endoteliales es capaz de inducir la formación de tubos (193).

En artritis inflamatorias, como ya se ha visto, el estrés oxidativo y la inflamación juegan un papel de gran relevancia, pero los tratamientos antiinflamatorios actuales a largo plazo presentan efectos adversos importantes, especialmente gástricos y cardiovasculares. Por ello, ha surgido un gran interés en el estudio de estrategias terapéuticas ofrecidas por compuestos naturales con propiedades antiinflamatorias. El RSV es un polifenol que se encuentra en altas concentraciones en frutos rojos y especialmente en la piel de las uvas negras y el vino tinto. Este compuesto, ha sido ampliamente estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* y en varios ensayos

clínicos y se le han atribuido propiedades antiinflamatorias, inmunorreguladoras, cardioprotectoras, antioxidantes, anticancerígenas y antienvjecimiento (130, 194-198). En modelos animales, RSV protege del desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y mejora la función mitocondrial (131, 136).

En este estudio se ha demostrado que, en sinoviocitos, el RSV es capaz de revertir la respuesta inflamatoria por la disfunción mitocondrial en combinación con la citoquina IL-1 $\beta$ . Los niveles de PGE<sub>2</sub> en los sinoviocitos tratados con RSV en nuestro modelo de disfunción mitocondrial, disminuyeron hasta niveles basales, mostrando un efecto tan eficaz como el AINE diclofenaco (resultados no mostrados). Además, la expresión de COX-2 e IL-8 mostró una drástica disminución. Probablemente, este efecto antiinflamatorio está debido, en parte, a su efecto antioxidante, ya que reduce los niveles de ROS inducidos por la disfunción mitocondrial en sinoviocitos, y a la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B en estas células, también descritos en este estudio.

De acuerdo al conocimiento que se posee sobre esta molécula, otros posibles mecanismos inducidos por RSV que podrían tener lugar en los sinoviocitos de nuestro modelo de disfunción mitocondrial consisten en el incremento de la actividad de Nrf2 o en la inducción de autofagia que elimine las mitocondrias dañadas (mitofagia) y/o biogénesis mitocondrial que las sustituya por mitocondrias sanas (131, 140, 199, 200). Con el envejecimiento, los procesos de mitofagia y biogénesis mitocondrial se ven alterados, permitiendo que las mitocondrias dañadas continúen generando ROS y provocando un ciclo de estrés oxidativo e inflamación (201). Por este motivo, el envejecimiento constituiría un factor agravante de la AR, y la administración de compuestos como el RSV podría ser beneficiosa.

La actividad protectora del RSV se ha demostrado también en sinoviocitos AR con disfunción mitocondrial, en los que puede revertir la expresión de COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8 (resultados no mostrados).

En cuanto al efecto inductor de angiogénesis de la disfunción mitocondrial en sinoviocitos, el RSV también resultó ser capaz de controlarlo. En este estudio se ha observado cómo el pretratamiento de los sinoviocitos con RSV es capaz de disminuir la expresión génica de

VEGF inducida por la disfunción mitocondrial así como la formación de tubos inducida por los sinoviocitos en células endoteliales.

Otros estudios han encontrado resultados similares en distintos tipos celulares en los que RSV inhibe la actividad COX-2 y la síntesis de PGE<sub>2</sub> mediada por COX-2, así como la producción de IL-8 a través de la disminución de estrés oxidativo y la inhibición de la activación de NF-κB (138, 202-206). En sinoviocitos AR, inhibe la liberación de IL-1β y MMP-3 inducida por TNFα (207); y en sinoviocitos provenientes de ratas con artritis inducida o en condrocitos articulares, RSV reduce la expresión de VEGF (208, 209). En otros tejidos, son muchas las evidencias del RSV como inhibidor de la angiogénesis patológica (210-212). Es probable, según la literatura sobre el tema, que uno de los mecanismos por los que el RSV ejerce estos efectos antiangiogénicos en la sinovial AR sea debido a su capacidad para inhibir directamente la función de la integrina αvβ3 (213). Esta integrina se encuentra altamente expresada en los vasos de la sinovial AR, mientras que apenas se expresa en vasos normales (214).

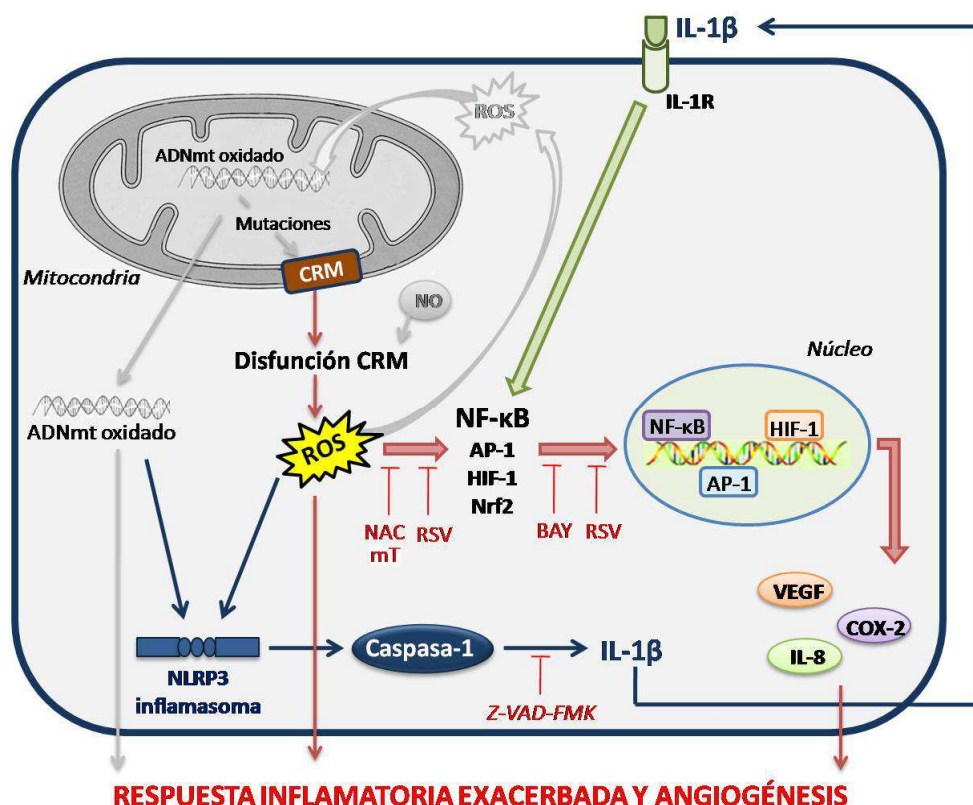
En conjunto, nuestros resultados, de acuerdo con otros trabajos de esta área de conocimiento, indican que el RSV puede representar una estrategia esperanzadora para controlar la respuesta inflamatoria en sinoviocitos y poder así atenuar los síntomas de las artritis inflamatorias.

Sin embargo, tal como indican las directrices propuestas por el grupo de trabajo del congreso Resveratrol 2010 (215), son necesarios más ensayos clínicos (en campos como el cáncer, donde la investigación está más avanzada) y estudios preliminares en otros campos para determinar la seguridad y el beneficio de un tratamiento crónico con RSV. En el área de las artritis inflamatorias, un posible futuro tratamiento con RSV podría complementar a los actuales tratamientos antiinflamatorios permitiendo la reducción de las dosis de éstos y, por tanto, de sus efectos adversos. Uno de los principales efectos adversos de los actuales antiinflamatorios, como el diclofenaco, es el daño gastrointestinal. Éste es provocado porque, al inhibir las ciclooxigenasas, inhiben la síntesis de prostaglandinas que tienen un efecto protector el estómago. Este efecto adverso se mejora, aunque no se llega a solucionar, con los AINES selectivos de COX-2. En este trabajo, se ha comprobado mediante citometrías conjuntas de COX-1/COX-2, que el RSV, siendo eficaz en la disminución de COX-2, no alteró la expresión de COX-1 en sinoviocitos. Sin embargo, la producción de PGE<sub>2</sub> en sinoviocitos tratados sólo con RSV

disminuye significativamente respecto a los no tratados. Probablemente, RSV esté inhibiendo la enzima mPGES, la última enzima implicada en la ruta de biosíntesis de la PGE<sub>2</sub>, ya que otros autores han encontrado este efecto en células de microglía de rata (216). Este efecto, por tanto, debe ser tenido en cuenta en futuros estudios, para encontrar un balance aceptable entre la dosis de RSV y el grado de inhibición adecuado de la síntesis de prostaglandinas, o la vía de administración.

En resumen, en este apartado se ha demostrado la participación de la disfunción mitocondrial en la respuesta inflamatoria de los sinoviocitos humanos. Esta participación resulta de mayor relevancia fisiológica en sinoviocitos expuestos a IL-1 $\beta$ , al provocar una amplificación de la señal inflamatoria. La disfunción mitocondrial ejercería estos efectos a través de la producción de ROS y de la activación de NF- $\kappa$ B, y postulamos que la activación del inflammasoma y de AP-1 puede estar también involucrada. Además, la disfunción mitocondrial también ha mostrado poseer efectos proangiogénicos, induciendo la activación de HIF-1 y la expresión de VEGF. Es posible que el uso de compuestos antioxidantes naturales como el RSV proporcione efectos beneficiosos en pacientes con AR. El conjunto de los resultados obtenidos en este apartado se integran en la Figura 70.





**Figura 70: Esquema teórico de las rutas implicadas en la respuesta inflamatoria y angiogénica inducida por la disfunción mitocondrial.** Como se ha descrito anteriormente, la AR está asociada a la disfunción mitocondrial y al estrés oxidativo, hechos que se correlacionan con el grado de inflamación del tejido sinovial afectado. Estas evidencias (mostradas previamente en la Figura 11), aparecen en gris en esta figura, mientras que se muestran en color las aportaciones del presente trabajo. En primer lugar, hemos confirmado por primera vez en sinoviocitos normales en cultivo, que la disfunción mitocondrial es capaz de inducir una respuesta inflamatoria (producción de COX-2 y su producto PGE<sub>2</sub>, e IL-8) a través de la generación de ROS y de la activación de NF-κB. Además, la disfunción mitocondrial induce la activación de otros factores de transcripción como AP-1 (que podría colaborar en la inducción de la expresión de mediadores inflamatorios), HIF-1 (que probablemente sea el principal responsable del incremento en la expresión de VEGF) y el factor antioxidante Nrf2. Además, cuando los sinoviocitos se encuentran en presencia de la citoquina IL-1β, ésta induce también la señalización inflamatoria a través de NF-κB, resultando en una amplificación de la expresión de los mediadores COX-2 (y PGE<sub>2</sub>) e IL-8. Es posible que en este incremento sinérgico de la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial esté involucrada la formación del inflammasoma (ruta en azul), que culmina con una mayor producción de IL-1β que, probablemente, sea la responsable de la amplificación de la señal inflamatoria al volver a comenzar el ciclo. Se muestran en rojo los compuestos utilizados que pueden bloquear estas rutas a distintos niveles: NAC (N-acetilcisteína) y mT (mitoTempo) interrumpen la señalización por ROS citoplasmáticos y mitocondriales, respectivamente; BAY inhibe la señalización NF-κB; RSV (resveratrol) actuaría a distintos niveles, al menos inhibiendo la producción de ROS y la activación de NF-κB; y Z-VAD-FMK inhibe la maduración de IL-1β por el inflammasoma al inhibir la activación de caspasas.

## **B. Estudio del efecto de una disfunción en el sistema antioxidante Nrf2/ARE sobre la capacidad angiogénica de células endoteliales de arteria coronaria humana.**

La vía de señalización de Nrf2 es de vital importancia en el organismo. Este factor de transcripción es responsable de la mayor parte de la defensa antioxidante y detoxificante de las células y, por ello, la alteración de su buen funcionamiento puede provocar efectos perjudiciales a distintos niveles. Así, la depleción genética de Nrf2 en animales los hace más sensibles al daño por oxidantes o agentes inflamatorios, mientras que la activación de Nrf2 permite la supervivencia y adaptación a distintas condiciones de estrés (217). Diversos mecanismos en el envejecimiento contribuyen a una supresión de la actividad Nrf2, con efectos perjudiciales en los tejidos afectados, en los que acelera el deterioro asociado a la edad.

El principal descubrimiento de este estudio es que una ruta funcional de Nrf2 es esencial para que tenga lugar una respuesta angiogénica endotelial eficaz, ya que una disfunción de la señalización Nrf2 en células endoteliales afecta negativamente a las principales etapas del proceso angiogénico: migración, proliferación, adhesión y formación de estructuras similares a capilares. Además, se ha demostrado que la alteración de Nrf2 también provoca un aumento de la sensibilidad de las células endoteliales a la muerte por apoptosis.

Como se ha descrito anteriormente, un incremento en la producción de ROS activa la señalización de Nrf2 al facilitar su disociación de la proteína inhibitoria Keap1. Los resultados de este estudio, que muestran que Nrf2 es necesario para la angiogénesis, concuerdan con un papel central de las rutas de señalización redox en múltiples propiedades angiogénicas de las células endoteliales.

La producción de ROS en respuesta a la estimulación con factores angiogénicos, especialmente mediada por las NADPH oxidasas endoteliales y también por la mitocondria, ha sido ampliamente descrita en la literatura (218-223). Así, se ha demostrado que la estimulación con VEGF incrementa la producción de ROS mediante la activación de NADPH oxidasas dependientes de Rac en células endoteliales. La unión de VEGF a su receptor VEGFR2 induce la activación de la GTPasa Rac1, que se trasloca desde el complejo formado por VEGFR2 hasta el

complejo proteico formado por la NADPH oxidasa. Esta unión estimula la NADPH oxidasa para la generación de ROS, que a su vez media la autofosforilación de VEGFR2 para dar lugar a la ruta de señalización redox que induce mecanismos angiogénicos como la proliferación o la migración (224). Otros estudios demuestran que la producción de ROS dependiente de NADPH oxidasas también está involucrada en la señalización de IGF-1 (222). En cuanto al papel de ROS generadas en la mitocondria, los estudios son escasos. Sin embargo, debido a la importancia de este orgánulo en la producción de ROS y su capacidad de movilidad intracelular, puede jugar un papel importante en la generación de incrementos locales de los niveles de ROS necesarios para estimular procesos angiogénicos. En este sentido, *Wang et al* demostraron que las ROS mitocondriales son necesarias para la migración de las células endoteliales inducida por VEGF, aunque el mecanismo exacto está por determinar (223).

Es lógico asumir, por tanto, que estos incrementos locales de los niveles de ROS inducidos por la activación de los receptores de VEGF e IGF-1 activan Nrf2, y que éste puede modular los efectos proangiogénicos de VEGF e IGF-1. De hecho, en este estudio, hemos comprobado que la estimulación de células endoteliales con VEGF o IGF-1 es capaz de inducir la activación de Nrf2, probablemente a través del incremento en la producción de ROS. Este resultado está corroborado por evidencias encontradas simultáneamente en nuestro grupo que muestran que ratones con una deficiencia en la producción de IGF-1 presentan una expresión disminuida de Nrf2 y sus genes relacionados (225).

Es posible que la inducción de enzimas antioxidantes mediada por Nrf2 juegue un papel importante al localizar la producción de ROS e integrar los eventos específicos de señalización redox que están involucrados en la angiogénesis, constituyendo así un paso necesario para la culminación de los procesos angiogénicos tras la estimulación con VEGF o IGF-1. De hecho, se ha demostrado que las rutas inducidas por Nrf2 juegan un papel importante en la señalización de los factores de crecimiento angiogénicos. Así, dichas rutas controlan la activación de los factores angiogénicos al regular la actividad de las quinasas que fosforilan sus receptores o también porque modulan los efectos de HIF-1 $\alpha$  (226, 227). Por ello, es posible que el defecto en la señalización Nrf2 observado durante el envejecimiento sea el responsable de que las células endoteliales pierdan la capacidad de respuesta a los factores proangiogénicos.

En el presente trabajo hemos comprobado esta hipótesis y hemos demostrado que una disfunción de la señalización Nrf2 impide los procesos de migración, proliferación, adhesión y formación de tubos en células endoteliales de arteria coronaria humanas. Así, se concluye que en estas células la expresión de Nrf2 es necesaria para llevar a cabo los procesos angiogénicos en respuesta a VEGF o IGF-1 *in vitro*. Esta conclusión ha sido apoyada por diversas observaciones que muestran, asimismo, que Nrf2 es necesario para el desarrollo del proceso angiogénico en diversas células y tejidos. De hecho, en un trabajo publicado posteriormente por Florczyk *et al*, mostraron resultados similares en células progenitoras endoteliales de médula ósea (228). En este trabajo se demostró que el silenciamiento de Nrf2 afecta al potencial angiogénico de estas células que, además, se ve restaurado al sobreexpresar HO-1 (enzima diana de Nrf2) o estimular las células con sulforafano (un conocido activador de Nrf2). También se ha visto que la depleción genética de Nrf2 *in vivo* atenúa significativamente la formación de la red de capilares en la retina durante el desarrollo (229). El proceso de angiogénesis también juega un papel esencial en cáncer. Así, se ha encontrado que el bloqueo de Nrf2 suprime la angiogénesis en cáncer de colon (227). Además, otras evidencias señalan que las dianas de Nrf2, HO-1 y tioredoxina, confieren efectos proangiogénicos (230-232).

Sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios en los que Nrf2 parece jugar un papel inhibitorio de la angiogénesis, al eliminar las ROS que se liberan en el tejido y que son necesarias para inducir la respuesta inflamatoria y la formación de nuevos vasos. Así, algunos estudios han encontrado que ratones con silenciamiento de Nrf2 muestran un incremento en la neovascularización inducida por isquemia en comparación con aquellos ratones sin deficiencia de Nrf2 (233, 234). El propio trabajo de Florczyk *et al*, mencionado anteriormente, también describe que, a pesar de que el silenciamiento de Nrf2 *in vitro* inhibe el potencial angiogénico de las células endoteliales, en ratones con deficiencia de Nrf2 se produce un incremento en el flujo sanguíneo en condiciones de isquemia, otorgando un papel clave a la inflamación en la neovascularización inducida por isquemia (228). Todo ello sugiere que deben existir diferencias importantes entre la angiogénesis que ocurre en distintos contextos, ya que son diversas las rutas de señalización que pueden inducir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Por ejemplo, los mecanismos que activan la angiogénesis tras un evento isquémico, que cuentan con un importante componente inflamatorio, son diferentes de los mecanismos que inducen angiogénesis en respuesta al ejercicio físico (98).

Además de regular el proceso angiogénico, Nrf2 también confiere efectos antiapoptóticos, que probablemente tienen un papel importante en la preservación de la integridad estructural de los capilares recién formados. Los resultados de este estudio demuestran que la disfunción de Nrf2 daña significativamente la resistencia al estrés oxidativo en células endoteliales exacerbando la muerte celular por apoptosis bajo condiciones asociadas a una elevada producción de ROS. Otros estudios corroboran este hallazgo y además comprueban que moléculas activadoras de este factor de transcripción poseen efectos protectores frente a la apoptosis de las células endoteliales (131, 225, 235-238). Es posible que los efectos antiapoptóticos de la activación de Nrf2 se deban, al menos en parte, a efectos protectores sobre la mitocondria (que probablemente previene la inducción de la ruta mitocondrial de muerte celular programada) o a la recuperación frente al incremento de la sensibilidad de los receptores de muerte observado en células deficientes en Nrf2 (239, 240).

Las consecuencias patofisiológicas de una angiogénesis defectuosa y un incremento de la vulnerabilidad a la apoptosis asociada con la disfunción de Nrf2 serían múltiples. Es probable que la depleción de Nrf2 disminuya la densidad capilar en el corazón y afectar negativamente a la angiogénesis cardíaca y/o formación colateral inducida por estímulos fisiológicos (como el ejercicio) o patológicos (como sobrecarga de presión). Como se ha comentado anteriormente, el envejecimiento resulta en una severa disminución de la expresión y actividad de Nrf2 en la vasculatura, que está asociada con un incremento en la tasa de apoptosis endotelial y rarefacción microvascular (103, 104, 109, 241, 242). La disfunción de Nrf2 asociada al envejecimiento se relaciona con un significativo incremento en la producción de ROS en células endoteliales (103, 104). Así, aunque la señalización de ROS es necesaria para la angiogénesis fisiológica, existen evidencias de que un excesivo estrés oxidativo tiene efectos perjudiciales en los procesos angiogénicos endoteliales, ya que inhibe la actividad de la eNOS, impide la proliferación celular y puede inducir apoptosis, afectando a la vasodilatación y a la formación de vasos colaterales (98).

Proponemos, por tanto, que la rarefacción microvascular y el defecto en la formación de vasos colaterales asociada con la disfunción de Nrf2 en el envejecimiento puede jugar un papel importante en la aparición de fallo y disfunción cardíaca con la edad y en su difícil reparación. Además, una disfunción de Nrf2 probablemente contribuya al aumento del estrés oxidativo y la

inflamación característicos del envejecimiento. De hecho, hemos observado que cuando Nrf2 se encuentra inhibido en células endoteliales, la activación de la ruta NF- $\kappa$ B es mayor (resultados no mostrados), pudiendo tener consecuencias relacionadas con la mayor propensión a la formación de la placa aterosclerótica, entre otras. Otros grupos han encontrado resultados similares respecto a la relación Nrf2/NF- $\kappa$ B en otros tejidos (243).

Es importante destacar que, aunque las estrategias proangiogénicas funcionan bien en animales de laboratorio jóvenes y sanos, una cantidad importante de ensayos clínicos en fase II/III destinados a inducir angiogénesis terapéutica en pacientes proporcionaron resultados decepcionantes (118, 244). Este hecho constituye un reflejo de la necesidad de más estudios sobre las rutas que tienen lugar durante la angiogénesis y sus modificaciones durante el envejecimiento, para así determinar cuáles serían las aproximaciones terapéuticas más efectivas. Como se ha demostrado, la disfunción del sistema Nrf2 durante el envejecimiento puede jugar un papel decisivo en el proceso angiogénico. Es posible que estos resultados negativos de los ensayos clínicos mencionados estén, al menos en parte, relacionados con la edad avanzada de los pacientes y su disfunción del sistema Nrf2, que impediría una correcta respuesta a los estímulos angiogénicos. Por ello, sería interesante determinar los posibles beneficios de la activación farmacológica de Nrf2 en cuanto a la inducción de una correcta respuesta angiogénica y/o la protección de los nuevos vasos sanguíneos frente a la apoptosis. En este sentido, se ha descubierto que Nrf2 puede ser activado farmacológicamente por el polifenol RSV en células endoteliales (131). El RSV puede ejercer efectos antiangiogénicos y proangiogénicos, en función de las circunstancias y el tipo celular. Así, aunque su efecto antiangiogénico está ampliamente demostrado en la literatura, especialmente relacionado con la neovascularización tumoral (212) o artrítica, se han encontrado suficientes evidencias de un papel proangiogénico en tejidos que sufren algún daño de tipo isquémico (245, 246). Especialmente, se han documentado las acciones antienvjecimiento del RSV entre las que se encuentra el incremento en el número de capilares en el cerebro de ratones viejos, la protección de las células endoteliales de la apoptosis y la disminución de la inflamación vascular asociada al envejecimiento (responsable de múltiples enfermedades vasculares) (198, 247-249). También otras moléculas antioxidantes y/o activadoras de Nrf2 pueden presentar efectos protectores que ayuden a preservar la función endotelial en el envejecimiento. Así, por ejemplo, se ha encontrado que el antioxidante Ebselen puede prevenir y revertir la senescencia de células

endoteliales *in vitro* (250); o que la curcumina, un polifenol derivado de la cúrcuma y encontrado en especias como el curry, puede proteger de la disfunción vascular asociada al envejecimiento (251, 252). El ejercicio físico moderado también posee efectos protectores del endotelio al inducir la activación de Nrf2 en el envejecimiento, o al inducir biogénesis mitocondrial tras isquemia cerebral (252-254).

Sin embargo, numerosos estudios sugieren que una activación continua y prolongada de Nrf2 puede ser perjudicial, ya que cantidades excesivas de este factor se relacionan con cáncer y quimiorresistencia (28). Se ha descubierto que Nrf2 se encuentra constitutivamente activado en diversos tipos de cáncer humano, de manera que las células transformadas “manipulan” esta vía para su beneficio al protegerse del estrés celular asociado a su alta tasa de proliferación, o del ambiente hipóxico (255, 256). Esta expresión anormal de Nrf2 se encuentra normalmente asociada a mutaciones en su represor, KEAP-1, o silenciamiento de éste mediante hipermetilación epigenética de su promotor aunque también se han observado casos de mutaciones puntuales en NRF2 que impiden su ubiquitinización (257-262). Por todo ello, en el desarrollo de estrategias terapéuticas para trastornos relacionados con el envejecimiento, es importante buscar un restablecimiento de la actividad de Nrf2 en lugar de una hiperestimulación de esta vía provocando una inducción constitutiva y a largo plazo.

En resumen, en este apartado se ha mostrado la importancia de Nrf2 en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Así, se ha demostrado que la disfunción de Nrf2, que suele ocurrir durante el envejecimiento, lleva consigo una disminución de la respuesta angiogénica de las células endoteliales frente a estímulos como VEGF o IGF-1 y una mayor susceptibilidad a la apoptosis. Sin embargo, son necesarios más estudios para comprender en qué casos una estimulación de la activación de Nrf2 resultaría en efectos beneficiosos para el paciente.





## CONCLUSIONES



**A. La disfunción mitocondrial influye significativamente sobre la respuesta inflamatoria del sinoviocito humano normal en cultivo.**

1. Oligomicina induce disfunción mitocondrial en sinoviocitos humanos normales en cultivo, al inducir despolarización mitocondrial, disminución de la producción de ATP y aumento en la producción de ROS mitocondriales.
2. La disfunción mitocondrial induce la expresión de los mediadores inflamatorios COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8 en sinoviocitos humanos normales en cultivo.
3. La disfunción mitocondrial hace más sensible al sinoviocito al efecto inflamatorio inducido por la citoquina IL-1 $\beta$ , al provocar la inducción sinérgica de los mediadores COX-2, PGE<sub>2</sub> e IL-8.
4. La producción de ROS, la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la activación de caspasas están involucrados en la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial tanto en presencia como en ausencia de IL-1 $\beta$  en el medio. El factor de transcripción proinflamatorio AP-1 es activado por la disfunción mitocondrial tanto en presencia como en ausencia de IL-1 $\beta$  en el medio, y también podría participar en la respuesta inflamatoria inducida por disfunción mitocondrial. La disfunción mitocondrial es capaz de inducir la activación de Nrf2.
5. Antimicina A y Paraquat inducen una respuesta inflamatoria similar a la inducida por oligomicina.
6. La disfunción mitocondrial en sinoviocitos humanos induce la activación del factor de transcripción HIF-1 y la expresión de VEGF. La liberación de VEGF, así como de IL-8, inducida por disfunción mitocondrial es capaz de inducir la formación de tubos en células endoteliales.
7. RSV ejerce un efecto antioxidante, antiinflamatorio y antiangiogénico en los sinoviocitos humanos con disfunción mitocondrial.

**B. La disfunción del sistema antioxidante Nrf2/ARE en células endoteliales de arteria coronaria humana afecta negativamente a su capacidad angiogénica.**

8. Los factores proangiogénicos VEGF e IGF-1 inducen la activación de Nrf2.
9. La disfunción del sistema Nrf2 en células endoteliales provoca una disminución en la capacidad de proliferación, adhesión, migración y formación de tubos de las células endoteliales.
10. El silenciamiento de Nrf2 induce una leve activación de las caspasas-3/7 y provoca la sensibilización de las células endoteliales a estímulos proapoptóticos.

En resumen, los resultados de este trabajo demuestran, por una parte, que la disfunción mitocondrial en los sinoviocitos participa en su respuesta inflamatoria al inducir la producción de mediadores inflamatorios y amplificar el efecto de IL-1 $\beta$ , y también mediante la inducción de la respuesta angiogénica. Por otra parte, se ha demostrado que el factor antioxidante Nrf2 es necesario para una correcta respuesta de las células endoteliales a los estímulos angiogénicos y para su supervivencia.

## CONCLUSIONS



**A. Mitochondrial dysfunction significantly contributes to the inflammatory response in cultured normal human synoviocytes.**

1. Oligomycin induces mitochondrial dysfunction in cultured normal human synoviocytes, by inducing mitochondrial depolarization, decrease in ATP production and increase in mitochondrial ROS production.
2. Mitochondrial dysfunction induces the expression of the inflammatory mediators COX-2, PGE<sub>2</sub> and IL-8 in cultured normal human synoviocytes.
3. Mitochondrial dysfunction renders synoviocytes more sensitive to the inflammatory effect induced by the cytokine IL-1 $\beta$ , by causing the synergistic induction of the mediators COX-2, PGE<sub>2</sub> and IL-8.
4. ROS production, activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B, and activation of caspases are involved in the inflammatory response induced by mitochondrial dysfunction, both in presence or absence of IL-1 $\beta$  in the culture medium. The pro-inflammatory transcription factor AP-1 is activated by mitochondrial dysfunction, both in presence or absence of IL-1 $\beta$  in the culture medium and might also participate in the inflammatory response induced by mitochondrial response. Mitochondrial dysfunction is able to induce the activation of Nrf2.
5. Antimycin A and Paraquat induce an inflammatory response similar to that induced by oligomycin.
6. Mitochondrial dysfunction in human synoviocytes induces the activation of the transcription factor HIF-1, and the expression of VEGF. The release of VEGF, as well as IL-8, induced by mitochondrial dysfunction is able to induce tube formation in endothelial cells.
7. Resveratrol presents an antioxidant, anti-inflammatory, and anti-angiogenic effect in human synoviocytes with mitochondrial dysfunction.

**B. Dysfunction of the antioxidant system Nrf2/ARE in human coronary artery endothelial cells impairs its angiogenic capacity.**

1. The pro-angiogenic factors VEGF e IGF-1 induce activation of Nrf2.
2. Dysfunction of the Nrf2 system in endothelial cells impairs the capacity of endothelial cells for proliferation, adhesion, migration, and tube formation.
3. Nrf2 disruption induces a slight activation of caspases-3/7 and sensitizes endothelial cells to pro-apoptotic stimuli.

In summary, the results obtained in this work demonstrate on the one hand, that mitochondrial dysfunction in synoviocytes participates in its inflammatory response by inducing the production of inflammatory mediators and amplifying the effect of IL-1 $\beta$ , and also by inducing an angiogenic response. On the other hand, the antioxidant factor Nrf2 has been proved to be essential for an appropriate response of endothelial cells to angiogenic stimuli and for its survival.



## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120(4):483-95.
2. Fang FC. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *MBio*. 2011;2(5).
3. Dinanuer MC. Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:89-95.
4. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K, et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res*. 2011;108(2):235-48.
5. Lugin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem*. 2013.
6. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(12):780-8.
7. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(6):265-78.
8. Gavrilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, Taylor RW, Young DA. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum*. 2013;65(2):378-87.
9. Khan SR. Stress oxidative: nephrolithiasis and chronic kidney diseases. *Minerva Med*. 2013;104(1):23-30.
10. Rahman I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat Respir Med*. 2005;4(3):175-200.
11. Pitocco D, Tesaro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21525-50.
12. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000;18(6):655-73.
13. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:239-67.
14. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006;443(7113):787-95.
15. Williams DL. Oxidative stress and the eye. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2008;38(1):179-92, vii.
16. Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(4):517-9.
17. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298-300.
18. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*. 1972;20(4):145-7.
19. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev*. 2002;54(1):101-27.
20. Miyoshi N, Oubrahim H, Chock PB, Stadtman ER. Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1727-31.

21. Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:145-69.
22. Pedersen PL. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr.* 1999;31(4):291-304.
23. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt 2):335-44.
24. Lippe G, Comelli M, Mazzilis D, Sala FD, Mavelli I. The inactivation of mitochondrial F1 ATPase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is mediated by iron ions not tightly bound in the protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181(2):764-70.
25. Zhang Q, Pi J, Woods CG, Andersen ME. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;244(1):84-97.
26. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(17):5718-34.
27. Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res.* 2010;690(1-2):12-23.
28. Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal.* 2010;3(112):re3.
29. Safdar A, deBeer J, Tarnopolsky MA. Dysfunctional Nrf2-Keap1 redox signaling in skeletal muscle of the sedentary old. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(10):1487-93.
30. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003;423(6937):356-61.
31. Cañete Crespillo JdD, Sanmartí i Sala R. Las artritis crónicas. In: S.L. MMC, editor. *Manual de Inflamación.* Madrid: Medical & Marketing Communications S.L.; 1999. p. 313-38.
32. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell.* 1996;85(3):307-10.
33. Lundkvist J, Kastäng F, Kobelt G. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs. *Eur J Health Econ.* 2008;8 Suppl 2:S49-60.
34. de Hair MJ, Landewé RB, van de Sande MG, van Schaardenburg D, van Baarsen LG, Gerlag DM, et al. Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012.
35. Navarro-Compán V, Melguizo-Madrid E, Hernández-Cruz B, Santos-Rey K, Leyva-Prado C, González-Martín C, et al. Interaction between oxidative stress and smoking is associated with an increased risk of rheumatoid arthritis: a case-control study. *Rheumatology (Oxford).* 2012.
36. Toes RE, van der Woude D. ACPA (anti-citrullinated protein antibodies) and rheumatoid arthritis. *Acta Reumatol Port.* 2011;36(3):205-7.
37. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol.* 2005;115(2):118-28.
38. Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(6):223.

39. Smith JB, Haynes MK. Rheumatoid arthritis--a molecular understanding. *Ann Intern Med.* 2002;136(12):908-22.
40. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(1):24-33.
41. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2001;344(12):907-16.
42. Ospelt C, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Synovial activation in rheumatoid arthritis. *Front Biosci.* 2004;9:2323-34.
43. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2001;358(9285):903-11.
44. Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Tulusso B, De Benedetti F. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med.* 2010;16(11-12):552-7.
45. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(4):232-41.
46. Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43 Suppl 3:iii2-iii9.
47. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum.* 2003;33(3):155-67.
48. Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm.* 2006;74:371-403.
49. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995;372(1):83-7.
50. Szekanecz Z, Strieter RM, Kunkel SL, Koch AE. Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 1998;20(1-2):115-32.
51. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 2002;72(5):847-55.
52. Kennedy A, Ng CT, Biniiecka M, Saber T, Taylor C, O'Sullivan J, et al. Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(3):711-21.
53. Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Santiago B, Usategui A, Sanmartí R, et al. Immature blood vessels in rheumatoid synovium are selectively depleted in response to anti-TNF therapy. *PLoS One.* 2009;4(12):e8131.
54. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, et al. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med.* 1994;180(1):341-6.
55. Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganelli P, Yeo K, Brown F, et al. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(1):176-82.

56. Makarov SS. NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res.* 2001;3(4):200-6.
57. Brown KD, Claudio E, Siebenlist U. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):212.
58. Kriete A, Mayo KL. Atypical pathways of NF-kappaB activation and aging. *Exp Gerontol.* 2009;44(4):250-5.
59. Kriete A, Mayo KL, Yalamanchili N, Beggs W, Bender P, Kari C, et al. Cell autonomous expression of inflammatory genes in biologically aged fibroblasts associated with elevated NF-kappaB activity. *Immun Ageing.* 2008;5:5.
60. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
61. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaller HB, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):201.
62. Hollander AP, Corke KP, Freemont AJ, Lewis CE. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum.* 2001;44(7):1540-4.
63. Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC, Paraskeva C. Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res.* 2006;66(13):6683-91.
64. Lukiw WJ, Ottlecz A, Lambrou G, Grueninger M, Finley J, Thompson HW, et al. Coordinate activation of HIF-1 and NF-kappaB DNA binding and COX-2 and VEGF expression in retinal cells by hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(10):4163-70.
65. Cane G, Ginouvès A, Marchetti S, Buscà R, Pouyssegur J, Berra E, et al. HIF-1alpha mediates the induction of IL-8 and VEGF expression on infection with Afa/Dr diffusely adhering E. coli and promotes EMT-like behaviour. *Cell Microbiol.* 2010;12(5):640-53.
66. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006;70(5):1469-80.
67. Gaber T, Dziurla R, Tripmacher R, Burmester GR, Buttgerit F. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O2! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis.* 2005;64(7):971-80.
68. Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg LO, Kan YW, Chan K, et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(5):844-50.
69. Kitamura A, Nishida K, Komiyama T, Doi H, Kadota Y, Yoshida A, et al. Increased level of heme oxygenase-1 in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Mod Rheumatol.* 2011;21(2):150-7.
70. Maicas N, Ferrándiz ML, Brines R, Ibáñez L, Cuadrado A, Koenders MI, et al. Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of arthritis and aggravates joint disease. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(4):889-901.
71. Moon SJ, Park JS, Woo YJ, Lim MA, Kim SM, Lee SY, et al. Rebamipide suppresses collagen-induced arthritis through reciprocal regulation of Th17/Treg differentiation and heme oxygenase-1 induction. *Arthritis Rheum.* 2013.

72. Fragoulis A, Laufs J, Müller S, Soppa U, Siegl S, Reiss LK, et al. Sulforaphane has opposing effects on TNF-alpha stimulated and unstimulated synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):R220.
73. Kataoka K, Handa H, Nishizawa M. Induction of cellular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by antirheumatic gold(I) compounds. *J Biol Chem*. 2001;276(36):34074-81.
74. Izquierdo E, Pablos JL. Fibroblastos sinoviales. *Semin Fund Esp Reumatol*. 2013;14(4):8.
75. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(5):R234-40.
76. Da Silva TR, Connor A, Mburu Y, Keystone E, Wu GE. Somatic mutations in the mitochondria of rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R844-51.
77. Biniecka M, Fox E, Gao W, Ng CT, Veale DJ, Fearon U, et al. Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(8):2172-82.
78. Ishikawa S, Mima T, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Imagawa T, et al. Abnormal expression of the genes involved in cytokine networks and mitochondrial function in systemic juvenile idiopathic arthritis identified by DNA microarray analysis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(2):264-72.
79. Moodley D, Mody G, Patel N, Chuturgoon AA. Mitochondrial depolarisation and oxidative stress in rheumatoid arthritis patients. *Clin Biochem*. 2008;41(16-17):1396-401.
80. Cillero-Pastor B, Martin MA, Arenas J, López-Armada MJ, Blanco FJ. Effect of nitric oxide on mitochondrial activity of human synovial cells. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:42.
81. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):415-22.
82. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem*. 2007;40(3-4):167-71.
83. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2002;21(5):200-4.
84. Maurice MM, Nakamura H, Gringhuis S, Okamoto T, Yoshida S, Kullmann F, et al. Expression of the thioredoxin-thioredoxin reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42(11):2430-9.
85. Heliövaara M, Knekt P, Aho K, Aaran RK, Alfthan G, Aromaa A. Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1994;53(1):51-3.
86. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem*. 2005;38(11):981-6.
87. Biniecka M, Kennedy A, Ng CT, Chang TC, Balogh E, Fox E, et al. Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):R121.

88. Bauerova K, Paulovicova E, Mihalova D, Drafi F, Strosova M, Mascia C, et al. Combined methotrexate and coenzyme Q<sub>10</sub> therapy in adjuvant-induced arthritis evaluated using parameters of inflammation and oxidative stress. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(3):347-54.
89. Harty LC, Biniecka M, O'Sullivan J, Fox E, Mulhall K, Veale DJ, et al. Mitochondrial mutagenesis correlates with the local inflammatory environment in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(4):582-8.
90. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* 2004;75(6):995-1000.
91. Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(19):11619-24.
92. Taylor PC, Sivakumar B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17(3):293-8.
93. Griendling KK, Harrison DG, Alexander RW. Molecular and Cellular Biology of Blood Vessels. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, editors. *Hurst's The Heart. Basic Foundations of Cardiology.* 1. USA: McGraw-Hill; 2001. p. 1-1488.
94. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res.* 2007;100(11):1659-66.
95. Csiszar A, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J Appl Physiol.* 2008;105(4):1333-41.
96. Ungvari Z, Orosz Z, Labinskyy N, Rivera A, Xiangmin Z, Smith K, et al. Increased mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production promotes endothelial NF-kappaB activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(1):H37-47.
97. Ungvari Z, Labinskyy N, Gupte S, Chander PN, Edwards JG, Csiszar A. Dysregulation of mitochondrial biogenesis in vascular endothelial and smooth muscle cells of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(5):H2121-8.
98. Lähdeenvuo J, Rosenzweig A. Effects of aging on angiogenesis. *Circ Res.* 2012;110(9):1252-64.
99. Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):226-35.
100. Chen JX, Zeng H, Tuo QH, Yu H, Meyrick B, Aschner JL. NADPH oxidase modulates myocardial Akt, ERK1/2 activation, and angiogenesis after hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(4):H1664-74.
101. Bir SC, Kolluru GK, Fang K, Kevil CG. Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(7):745-57.
102. Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem.* 2004;264(1-2):85-97.
103. Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, Sosnowska D, Wang M, Monticone RE, et al. Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- $\kappa$ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011;66(8):866-75.



104. Ungvari Z, Bailey-Downs L, Sosnowska D, Gautam T, Koncz P, Losonczy G, et al. Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(2):H363-72.
105. Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, Tangirala RK, Yin F, et al. Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res*. 2009;104(6):e42-54.
106. Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, Jimenez R, Losonczy G, Zhang C, et al. Adaptive induction of NF-E2-related factor-2-driven antioxidant genes in endothelial cells in response to hyperglycemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(4):H1133-40.
107. Ungvari Z, Sonntag WE, Csiszar A. Mitochondria and aging in the vascular system. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(10):1021-7.
108. le Noble FA, Stassen FR, Hacking WJ, Struijker Boudier HA. Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens*. 1998;16(11):1563-72.
109. Riddle DR, Sonntag WE, Lichtenwalner RJ. Microvascular plasticity in aging. *Ageing Res Rev*. 2003;2(2):149-68.
110. Rizzoni D, Pasini E, Flati V, Rodella LF, Paiardi S, Assanelli D, et al. Angiotensin receptor blockers improve insulin signaling and prevent microvascular rarefaction in the skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2008;26(8):1595-601.
111. Novella S, Dantas AP, Segarra G, Vidal-Gómez X, Mompeón A, Garabito M, et al. Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. *Exp Gerontol*. 2013;48(11):1329-37.
112. Wagatsuma A. Effect of aging on expression of angiogenesis-related factors in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol*. 2006;41(1):49-54.
113. Ryan NA, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Hickner RC, Pofahl WE, Gavin TP. Lower skeletal muscle capillarization and VEGF expression in aged vs. young men. *J Appl Physiol*. 2006;100(1):178-85.
114. Croley AN, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Ryan NA, Pendergast AM, Hickner RC, et al. Lower capillarization, VEGF protein, and VEGF mRNA response to acute exercise in the vastus lateralis muscle of aged vs. young women. *J Appl Physiol*. 2005;99(5):1872-9.
115. Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, Kearney M, Curry C, Branellec D, et al. Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem*. 2000;275(38):29643-7.
116. Weinstein RS, Wan C, Liu Q, Wang Y, Almeida M, O'Brien CA, et al. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. *Aging Cell*. 2010;9(2):147-61.
117. Ahluwalia A, Narula J, Jones MK, Deng X, Tarnawski AS. Impaired angiogenesis in aging myocardial microvascular endothelial cells is associated with reduced importin alpha and decreased nuclear transport of HIF1 alpha: mechanistic implications. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(2):133-9.
118. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*. 2003;107(10):1359-65.

119. Kastrup J, Jørgensen E, Rück A, Tägil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(7):982-8.
120. Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A, Pearlman JD, Bunting S, Kaplan A, et al. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res*. 1998;40(2):272-81.
121. Ungvari Z, Csiszar A. The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67(6):599-610.
122. Gao P, Shen F, Gabriel RA, Law D, Yang E, Yang GY, et al. Attenuation of brain response to vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and neurogenesis in aged mice. *Stroke*. 2009;40(11):3596-600.
123. Mieno S, Boodhwani M, Clements RT, Ramlawi B, Sodha NR, Li J, et al. Aging is associated with an impaired coronary microvascular response to vascular endothelial growth factor in patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132(6):1348-55.
124. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest*. 1999;79(12):1479-87.
125. Garfinkel S, Hu X, Prudovsky IA, McMahon GA, Kapnik EM, McDowell SD, et al. FGF-1-dependent proliferative and migratory responses are impaired in senescent human umbilical vein endothelial cells and correlate with the inability to signal tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor receptor-1 substrates. *J Cell Biol*. 1996;134(3):783-91.
126. Phillips GD, Stone AM. PDGF-BB induced chemotaxis is impaired in aged capillary endothelial cells. *Mech Ageing Dev*. 1994;73(3):189-96.
127. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999;99(1):111-20.
128. Koike T, Vernon RB, Gooden MD, Sadoun E, Reed MJ. Inhibited angiogenesis in aging: a role for TIMP-2. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003;58(9):B798-805.
129. Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol*. 1999;68(1-3):71-6.
130. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*. 2004;24(5A):2783-840.
131. Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE, Pearson K, et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 299. United States 2010. p. H18-24.
132. Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(5):800-13.
133. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(1):115-28.
134. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation*. 2007;30(1-2):1-6.

135. Riveiro-Naveira RR, Loureiro J, Centeno-Cortés A, López-Peláez E, Vaamonde-García C, Valcárcel-Ares MN, et al. Anti-Inflammatory Effect Of Resveratrol As a Dietary Supplement In An Antigen-Induced Arthritis Rat Model. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(10 (Supplement)):2.
136. Xuzhu G, Komai-Koma M, Leung BP, Howe HS, McSharry C, McInnes IB, et al. Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(1):129-35.
137. Glehr M, Fritsch-Breisach M, Lohberger B, Walzer SM, Moazedi-Fuerst F, Rinner B, et al. Influence of resveratrol on rheumatoid fibroblast-like synoviocytes analysed with gene chip transcription. *Phytomedicine*. 2013;20(3-4):310-8.
138. Vaamonde-García C, Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, López-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction increases the inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2012.
139. Dave M, Attur M, Palmer G, Al-Mussawir HE, Kennish L, Patel J, et al. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis Rheum*. 2008;58(9):2786-97.
140. Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(1):H13-20.
141. Chen ML, Yi L, Jin X, Liang XY, Zhou Y, Zhang T, et al. Resveratrol attenuates vascular endothelial inflammation by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. *Autophagy*. 2013;9(12).
142. Low IC, Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(6):807-19.
143. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 5):1156-60.
144. Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 2012;148(3):421-33.
145. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- $\kappa$ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89(7):667-76.
146. Komen JC, Thorburn DR. Turn up the power - pharmacological activation of mitochondrial biogenesis in mouse models. *Br J Pharmacol*. 2013.
147. Cillero-Pastor B, Caramés B, Lires-Deán M, Vaamonde-García C, Blanco FJ, López-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2409-19.
148. Shchepina LA, Pletjushkina OY, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Fetisova EK, Izyumov DS, et al. Oligomycin, inhibitor of the F<sub>0</sub> part of H<sup>+</sup>-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(53):8149-57.
149. Bitar MS, Al-Mulla F. A defect in Nrf2 signaling constitutes a mechanism for cellular stress hypersensitivity in a genetic rat model of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;301(6):E1119-29.

150. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*. 2011;50(2):98-115.
151. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(1):1-6.
152. Caramés B, Taniguchi N, Seino D, Blanco FJ, D'Lima D, Lotz M. Mechanical injury suppresses autophagy regulators and pharmacologic activation of autophagy results in chondroprotection. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1182-92.
153. López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, et al. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(7):660-9.
154. Ospelt C, Gay S. Somatic mutations in mitochondria: the chicken or the egg? *Arthritis Res Ther*. 2005;7(5):179-80.
155. Kwong JQ, Beal MF, Manfredi G. The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J Neurochem*. 2006;97(6):1659-75.
156. Leuner K, Schütt T, Kurz C, Eckert SH, Schiller C, Occhipinti A, et al. Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(12):1421-33.
157. Kramar R, Hohenegger M, Srouf AN, Khanakah G. Oligomycin toxicity in intact rats. *Agents Actions*. 1984;15(5-6):660-3.
158. Kucharczyk R, Zick M, Bietenhader M, Rak M, Couplan E, Blondel M, et al. Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(1):186-99.
159. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed. ed. New York ; Basingstoke: W.H. Freeman; 2008.
160. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
161. Chang X, Wei C. Glycolysis and rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2011;14(3):217-22.
162. Peng TI, Jou MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1201:183-8.
163. Stanczyk J, Ospelt C, Gay RE, Gay S. Synovial cell activation. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18(3):262-7.
164. Siegle I, Klein T, Backman JT, Saal JG, Nüsing RM, Fritz P. Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum*. 1998;41(1):122-9.
165. Vaamonde-García C, Loureiro J, López-Peláez E, Centeno-Cortés A, Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, et al. The Intraarticular Injection Of An Inhibitor Of Complex V Of Mitochondrial Respiratory Chain Induces a Pathological Response In Rat Knee Joints. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(10 (Supplement)):2.
166. Wright HL, Bucknall RC, Moots RJ, Edwards SW. Analysis of SF and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(3):451-9.

167. Abramson SB, Amin A. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(9):972-80.
168. Faour WH, He Y, He QW, de Ladurantaye M, Quintero M, Mancini A, et al. Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001;276(34):31720-31.
169. Kumagai T, Kawamoto Y, Nakamura Y, Hatayama I, Satoh K, Osawa T, et al. 4-hydroxy-2-nonenal, the end product of lipid peroxidation, is a specific inducer of cyclooxygenase-2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(2):437-41.
170. Kumagai T, Matsukawa N, Kaneko Y, Kusumi Y, Mitsumata M, Uchida K. A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator: identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem*. 2004;279(46):48389-96.
171. Biniecka M, Kennedy A, Fearon U, Ng CT, Veale DJ, O'Sullivan JN. Oxidative damage in synovial tissue is associated with in vivo hypoxic status in the arthritic joint. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):1172-8.
172. Li X, Ellman M, Muddasani P, Wang JH, Cs-Szabo G, van Wijnen AJ, et al. Prostaglandin E2 and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(2):513-23.
173. Aguilera-Aguirre L, Bacsi A, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S, Boldogh I. Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation. *J Immunol*. 2009;183(8):5379-87.
174. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J*. 1993;12(8):3095-104.
175. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2009;8(1):18-30.
176. Amma H, Naruse K, Ishiguro N, Sokabe M. Involvement of reactive oxygen species in cyclic stretch-induced NF-kappaB activation in human fibroblast cells. *Br J Pharmacol*. 2005;145(3):364-73.
177. Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(3-4):395-403.
178. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kB signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011;12(8):695-708.
179. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469(7329):221-5.
180. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):210-5.
181. Escames G, López LC, García JA, García-Corzo L, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet*. 2012;131(2):161-73.
182. Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondrial control of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2011;12(3):199-200.

183. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010;464(7285):104-7.
184. Cascão R, Polido-Pereira J, Canhão H, Rodrigues AM, Navalho M, Raquel H, et al. Caspase-1 is active since the early phase of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(1):144.
185. Tschopp J. Mitochondria: Sovereign of inflammation? *Eur J Immunol*. 2011;41(5):1196-202.
186. Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Kauppinen A. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: impact on the aging process and age-related diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(18):2999-3013.
187. Geborek P, Forslind K, Wollheim FA. Direct assessment of synovial blood flow and its relation to induced hydrostatic pressure changes. *Ann Rheum Dis*. 1989;48(4):281-6.
188. Garedew A, Moncada S. Mitochondrial dysfunction and HIF1alpha stabilization in inflammation. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 20):3468-75.
189. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006;3(3):187-97.
190. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006;3(3):177-85.
191. Demasi M, Cleland LG, Cook-Johnson RJ, James MJ. Effects of hypoxia on the expression and activity of cyclooxygenase 2 in fibroblast-like synoviocytes: interactions with monocyte-derived soluble mediators. *Arthritis Rheum*. 2004;50(8):2441-9.
192. Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J*. 2003;17(14):2115-7.
193. Shimizu S, Yasuda M, Ishii M, Nagai T, Kiuchi Y, Yamamoto T. Stimulation of in vitro angiogenesis by tetrahydrobiopterin in bovine aortic endothelial cells. *Jpn J Pharmacol*. 1999;80(2):177-80.
194. Magyar K, Halmosi R, Palfi A, Feher G, Czopf L, Fulop A, et al. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012;50(3):179-87.
195. Movahed A, Yu L, Thandapilly SJ, Louis XL, Netticadan T. Resveratrol protects adult cardiomyocytes against oxidative stress mediated cell injury. *Arch Biochem Biophys*. 2012;527(2):74-80.
196. Singh NP, Hegde VL, Hofseth LJ, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) ameliorates experimental allergic encephalomyelitis, primarily via induction of apoptosis in T cells involving activation of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor. *Mol Pharmacol*. 2007;72(6):1508-21.
197. Bereswill S, Muñoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One*. 2010;5(12):e15099.

198. Csiszar A, Sosnowska D, Wang M, Lakatta EG, Sonntag WE, Ungvari Z. Age-Associated Proinflammatory Secretory Phenotype in Vascular Smooth Muscle Cells From the Non-human Primate *Macaca mulatta*: Reversal by Resveratrol Treatment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012.
199. He X, Wang L, Szklarz G, Bi Y, Ma Q. Resveratrol inhibits paraquat-induced oxidative stress and fibrogenic response by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342(1):81-90.
200. Guo H, Chen Y, Liao L, Wu W. Resveratrol protects HUVECs from oxidized-LDL induced oxidative damage by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 pathway. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013;27(3):189-98.
201. López-Lluch G, Irusta PM, Navas P, de Cabo R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol*. 2008;43(9):813-9.
202. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(4):L774-83.
203. Sato M, Miyazaki T, Nagaya T, Murata Y, Ida N, Maeda K, et al. Antioxidants inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated stimulation of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, and collagenase expression in cultured human synovial cells. *J Rheumatol*. 1996;23(3):432-8.
204. Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, Satofuka S, Noda K, Ozawa Y, et al. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(7):3512-9.
205. Sexton E, Van Themsche C, LeBlanc K, Parent S, Lemoine P, Asselin E. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. *Mol Cancer*. 2006;5:45.
206. Cianciulli A, Calvello R, Cavallo P, Dragone T, Carofiglio V, Panaro MA. Modulation of NF- $\kappa$ B activation by resveratrol in LPS treated human intestinal cells results in downregulation of PGE2 production and COX-2 expression. *Toxicol In Vitro*. 2012;26(7):1122-8.
207. Tian J, Chen JW, Gao JS, Li L, Xie X. Resveratrol inhibits TNF- $\alpha$ -induced IL-1 $\beta$ , MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of PI3kinase/Akt pathway. *Rheumatol Int*. 2013;33(7):1829-35.
208. Chen XY, Wang ZC, Li J, Liu XL, Sun YH. Regulation of synoviocyte activity by resveratrol in rats with adjuvant arthritis. *Exp Ther Med*. 2013;6(1):172-6.
209. Shakibaei M, Csaki C, Nebrich S, Mobasheri A. Resveratrol suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(11):1426-39.
210. Khan AA, Dace DS, Ryazanov AG, Kelly J, Apte RS. Resveratrol regulates pathologic angiogenesis by a eukaryotic elongation factor-2 kinase-regulated pathway. *Am J Pathol*. 2010;177(1):481-92.
211. Cullberg KB, Olholm J, Paulsen SK, Foldager CB, Lind M, Richelsen B, et al. Resveratrol has inhibitory effects on the hypoxia-induced inflammation and angiogenesis in human adipose tissue in vitro. *Eur J Pharm Sci*. 2013;49(2):251-7.



212. Fouad MA, Agha AM, Merzabani MM, Shouman SA. Resveratrol inhibits proliferation, angiogenesis and induces apoptosis in colon cancer cells: calorie restriction is the force to the cytotoxicity. *Hum Exp Toxicol*. 2013;32(10):1067-80.
213. Belleri M, Ribatti D, Savio M, Stivala LA, Forti L, Tanghetti E, et al.  $\alpha$ v $\beta$ 3 Integrin-dependent antiangiogenic activity of resveratrol stereoisomers. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(12):3761-70.
214. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. Adhesion molecule expression in human synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 1993;36(2):137-46.
215. Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, et al. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One*. 2011;6(6):e19881.
216. Candelario-Jalil E, de Oliveira AC, Gräf S, Bhatia HS, Hüll M, Muñoz E, et al. Resveratrol potently reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J Neuroinflammation*. 2007;4:25.
217. Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol*. 2011;85(4):241-72.
218. West XZ, Malinin NL, Merkulova AA, Tischenko M, Kerr BA, Borden EC, et al. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature*. 2010;467(7318):972-6.
219. Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett*. 2008;266(1):37-52.
220. Abid MR, Spokes KC, Shih SC, Aird WC. NADPH oxidase activity selectively modulates vascular endothelial growth factor signaling pathways. *J Biol Chem*. 2007;282(48):35373-85.
221. Abid MR, Kachra Z, Spokes KC, Aird WC. NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Lett*. 2000;486(3):252-6.
222. Handayaningsih AE, Iguchi G, Fukuoka H, Nishizawa H, Takahashi M, Yamamoto M, et al. Reactive oxygen species play an essential role in IGF-I signaling and IGF-I-induced myocyte hypertrophy in C2C12 myocytes. *Endocrinology*. 2011;152(3):912-21.
223. Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulani G, et al. Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(3):C695-704.
224. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, et al. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem*. 2002;277(5):3101-8.
225. Bailey-Downs LC, Mitschelen M, Sosnowska D, Toth P, Pinto JT, Ballabh P, et al. Liver-specific knockdown of IGF-1 decreases vascular oxidative stress resistance by impairing the Nrf2-dependent antioxidant response: a novel model of vascular aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67(4):313-29.
226. Beyer TA, Xu W, Teupser D, auf dem Keller U, Bugnon P, Hildt E, et al. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J*. 2008;27(1):212-23.
227. Kim TH, Hur EG, Kang SJ, Kim JA, Thapa D, Lee YM, et al. NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 $\alpha$ . *Cancer Res*. 2011;71(6):2260-75.



228. Florczyk U, Jazwa A, Maleszewska M, Mendel M, Szade K, Kozakowska M, et al. Nrf2 regulates angiogenesis: effect on endothelial cells, bone marrow-derived proangiogenic cells and hind limb ischemia. *Antioxid Redox Signal*. 2013.
229. Uno K, Prow TW, Bhutto IA, Yerrapureddy A, McLeod DS, Yamamoto M, et al. Role of Nrf2 in retinal vascular development and the vaso-obliterative phase of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res*. 2010;90(4):493-500.
230. Deramandt BM, Braunstein S, Remy P, Abraham NG. Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem*. 1998;68(1):121-7.
231. Grochot-Przeczek A, Kotlinowski J, Kozakowska M, Starowicz K, Jagodzinska J, Stachurska A, et al. Heme oxygenase-1 is required for angiogenic function of bone marrow-derived progenitor cells: role in therapeutic revascularization. *Antioxid Redox Signal*. 2013.
232. Adluri RS, Thirunavukkarasu M, Zhan L, Akita Y, Samuel SM, Otani H, et al. Thioredoxin 1 enhances neovascularization and reduces ventricular remodeling during chronic myocardial infarction: a study using thioredoxin 1 transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(1):239-47.
233. Nijmeh J, Moldobaeva A, Wagner EM. Role of ROS in ischemia-induced lung angiogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 299. United States 2010. p. L535-41.
234. Ichihara S, Yamada Y, Liu F, Murohara T, Itoh K, Yamamoto M, et al. Ablation of the transcription factor Nrf2 promotes ischemia-induced neovascularization by enhancing the inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(8):1553-61.
235. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest*. 2004;114(9):1248-59.
236. Ziaei A, Schmedt T, Chen Y, Jurkunas UV. Sulforaphane decreases endothelial cell apoptosis in fuchs endothelial corneal dystrophy: a novel treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(10):6724-34.
237. Zhang T, Wang F, Xu HX, Yi L, Qin Y, Chang H, et al. Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and PPAR $\gamma$  plays a role in the genistein-mediated attenuation of oxidative stress-induced endothelial cell injury. *Br J Nutr*. 2013;109(2):223-35.
238. Donovan EL, McCord JM, Reuland DJ, Miller BF, Hamilton KL. Phytochemical activation of Nrf2 protects human coronary artery endothelial cells against an oxidative challenge. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:132931.
239. Morito N, Yoh K, Itoh K, Hirayama A, Koyama A, Yamamoto M, et al. Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels. *Oncogene*. 2003;22(58):9275-81.
240. Wang X, Chen HL, Liu JZ, Liao N, Yu WH, Zhang XD, et al. Protective effect of oleanolic acid against beta cell dysfunction and mitochondrial apoptosis: crucial role of ERK-NRF2 signaling pathway. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2013;27(1):55-67.
241. Csiszar A, Ungvari Z, Koller A, Edwards JG, Kaley G. Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging. *Physiol Genomics*. 2004;17(1):21-30.
242. Faber JE, Zhang H, Lassance-Soares RM, Prabhakar P, Najafi AH, Burnett MS, et al. Aging causes collateral rarefaction and increased severity of ischemic injury in multiple tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(8):1748-56.

243. Pan H, Wang H, Wang X, Zhu L, Mao L. The absence of Nrf2 enhances NF- $\kappa$ B-dependent inflammation following scratch injury in mouse primary cultured astrocytes. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:217580.
244. Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ Res.* 2009;105(8):724-36.
245. Chen Y, Tseng SH. Review. Pro- and anti-angiogenesis effects of resveratrol. *In Vivo.* 2007;21(2):365-70.
246. Fukuda S, Kaga S, Zhan L, Bagchi D, Das DK, Bertelli A, et al. Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosine kinase receptor Flk-1. *Cell Biochem Biophys.* 2006;44(1):43-9.
247. Oomen CA, Farkas E, Roman V, van der Beek EM, Luiten PG, Meerlo P. Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. *Front Aging Neurosci.* 2009;1:4.
248. Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N, Xiangmin Z, Olson S, et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(5):H2417-24.
249. Cheng X, Siow RC, Mann GE. Impaired redox signaling and antioxidant gene expression in endothelial cells in diabetes: a role for mitochondria and the nuclear factor-E2-related factor 2-Kelch-like ECH-associated protein 1 defense pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(3):469-87.
250. Brodsky SV, Gealekman O, Chen J, Zhang F, Togashi N, Crabtree M, et al. Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. *Circ Res.* 2004;94(3):377-84.
251. Fleenor BS, Sindler AL, Marvi NK, Howell KL, Zigler ML, Yoshizawa M, et al. Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging. *Exp Gerontol.* 2013;48(2):269-76.
252. Akazawa N, Choi Y, Miyaki A, Tanabe Y, Sugawara J, Ajisaka R, et al. Curcumin ingestion and exercise training improve vascular endothelial function in postmenopausal women. *Nutr Res.* 2012;32(10):795-9.
253. Zhang Q, Wu Y, Zhang P, Sha H, Jia J, Hu Y, et al. Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats. *Neuroscience.* 2012;205:10-7.
254. Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KS, Odelberg SJ, et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One.* 2012;7(9):e45697.
255. Hayes JD, McMahon M. The double-edged sword of Nrf2: subversion of redox homeostasis during the evolution of cancer. *Mol Cell.* 2006;21(6):732-4.
256. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 2013;1(1):45-9.
257. Nioi P, Nguyen T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 362. United States2007. p. 816-21.
258. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med.* 2006;3(10):e420.
259. Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, et al. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.* 68. United States2008. p. 1303-9.

260. Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13568-73.
261. Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, Ojima H, Ohta T, Yamamoto M, et al. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1358-68, 68.e1-4.
262. Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R, Itoh J, et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:66.



El trabajo de investigación incluido en esta tesis doctoral ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos originales:

- **Valcarcel-Ares, M. N.**, Gautam, T., Warrington, J. P., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., de Cabo, R., Losonczy, G., Sonntag, W. E., Ungvari, Z., Csiszar, A. Disruption of Nrf2 Signaling Impairs Angiogenic Capacity of Endothelial Cells: Implications for Microvascular Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 Aug;67(8):821-9. PMID: 22219515
- **Valcárcel-Ares, M. N.**, Riveiro-Naveira, R. R., Vaamonde-García, C., Loureiro J., Hermida-Carballo, L., Blanco, F. J., López-Armada, M. J. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology* 2014 doi:10.1093/rheumatology/keu016 [En prensa].
- **Valcárcel-Ares, M. N.**, Riveiro-Naveira, R. R., Vaamonde-García, C., Loureiro J., Hermida-Carballo, L., Blanco, F. J., López-Armada, M. J. Mitochondrial dysfunction induces an inflammatory, angiogenic and tissue degrading phenotype in human synoviocytes. 2014 [En elaboración].

